

Adriane Mouro

**CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* DE XILOSE REDUTASES E XILITOL  
DESIDROGENASE DAS LEVEDURAS BRASILEIRAS  
*SPATHASPORA ARBORARIAE* E *SPATHASPORA  
PASSALIDARUM***

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Boris U.  
Stambuk

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mouro, Adriane

CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DE  
XILOSE REDUTASES E XILITOL DESIDROGENASE DAS LEVEDURAS  
BRASILEIRAS *SPATHASPORA ARBORARIAE* E *SPATHASPORA*  
*PASSALIDARUM* / Adriane Mouro ; orientador, Boris J. Ugarte  
Stambuk - Florianópolis, SC, 2016.

113 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. bioetanol. 3. *Saccharomyces*  
*cerevisiae*. 4. fermentação. 5. xilose. I. Stambuk, Boris J.  
Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.


**"Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da  
biodiversidade brasileira"**

POR

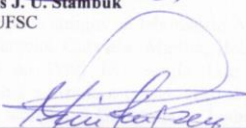
**ADRIANE MOURO**


**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientadores e  
membros da Comissão Examinadora.**

Orientador:


  
Prof. Dr. Bóris J. U. Stambuk  
BQA/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Márcio José Rossi  
MIP/CCB/UFSC

  
Prof. Dr. Luiz Carlos Basso  
Depto. Ciências Biológicas/USP

  
Prof. Dr. Angélica Francesca Maris  
BEG/CCB/UFSC

  
Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC  
Florianópolis, Março de 2012.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Boris, pela sua orientação, apoio, dedicação e pelos seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, e sobretudo, pela oportunidade concedida a mim de fazer parte do seu grupo de trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Alice, Catarina, Davi, Débora, Augusto, Marcelo, Gabriela, Marília, Belisa, Vitor, Angela, Wallace, Junior, Sérgio, Maria de Lourdes que contribuíram com a sua amizade e colaboração dentro do laboratório. Agradeço muitíssimo também, a Bruna, Gabriela e Ana Paula, que dividiram bancada comigo como iniciação científica e contribuíram para o meu trabalho.

Aos colegas e professores do Laboratório de Defesas Celulares e Laboratório de Bioquímica de Insetos, pela divisão do espaço de trabalho, equipamentos e sempre amizade e ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos e familiares, principalmente ao meu esposo Sérgio que me apoiou e ajudou todas as vezes que precisei.

À JICA (Japan International Cooperation Agency) e FINEP, pelo suporte financeiro e oportunidade concedida de realizar parte do meu doutorado no AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology – Hiroshima, Japão)

À CAPES-FCT (Fundação para Ciência e Tecnologia), pelo suporte financeiro e oportunidade concedida de realizar parte do meu doutorado no LNEG (Laboratório Nacional de Energia e Geologia- Lisboa, Portugal).

À CAPES-DS pelo apoio financeiro, durante estes quatro anos de doutorado.



## RESUMO

O álcool combustível tem adquirido importância nos últimos anos devido ao futuro esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, bem como o impacto ambiental pela emissão de poluentes que estes combustíveis fósseis apresentam. Uma atrativa fonte de matéria prima para a obtenção de etanol é a biomassa lignocelulósica, composta de lignina, celulose e hemicelulose, sendo que estes dois últimos polímeros podem ser utilizados nos processos fermentativos para a produção de álcool combustível. Embora a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* fermente eficientemente hexoses, esta levedura é incapaz de fermentar pentoses como a xilose, o principal açúcar presente nos hidrolisados de hemicelulose. A enzima xilose redutase (XR) é o primeiro passo no metabolismo da xilose, uma enzima NAD(P)H-dependente que reduz xilose a xilitol, mas o desbalanço causado pela xilitol desidrogenase dependente de  $\text{NAD}^+$  (a segunda enzima do metabolismo da xilose) pode levar ao acúmulo de xilitol. Então, a seleção de XRs com alta atividade enzimática e afinidade pelos dois cofatores é importante para o aumento da produtividade de etanol a partir da xilose. No presente trabalho foram clonados genes que codificam para possíveis XRs de duas leveduras do gênero *Spathaspora* (*S. passalidarum* e *S. arborariae*), e também foi clonada uma xilitol desidrogenase de *S. passalidarum*, ambas leveduras naturalmente fermentadoras de xilose. Estes genes foram expressos em uma linhagem de *S. cerevisiae* para avaliar a funcionalidade das enzimas. Nossos resultados mostraram que um gene anotado no genoma de *S. arborariae* (também presente em *S. passalidarum*) como XR, não exibiram atividade com este açúcar, e provavelmente trata-se de aldo-ceto redutases com especificidades desconhecidas. Outro gene foi amplificado de *S. arborariae* e *S. passalidarum*, e quando expressos em *S. cerevisiae*, o gene de *S. arborariae* apresentou atividade XR com ambos os cofatores (NADH e NADPH), enquanto que o gene obtido de *S. passalidarum* só exibiu atividade de XR dependente de NADPH. A atividade da xilitol desidrogenase clonada de *S. passalidarum*, quando expressa em *S. cerevisiae*, mostrou uma enzima completamente dependente de  $\text{NAD}^+$ . Linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes, expressando as diferentes enzimas do metabolismo da xilose clonadas no presente trabalho, foram capazes de crescer e consumir xilose, porém com baixa produção de etanol, e significativa produção de xilitol. Isto provavelmente se deve a baixa atividade da enzima xilitol desidrogenase nas linhagens recombinantes. De fato, mesmo nas fermentações de

xilose em batelada, as células recombinantes produziram mais xilitol do que etanol. Finalmente, durante co-fermentações de xilose/glicose, as leveduras recombinantes produziram mais xilitol e acetato do que etanol a partir da xilose, indicando que provavelmente o desbalanço de cofatores ainda está determinando o destino dos carbonos provenientes da xilose. Portanto, nossos resultados indicam a presença de diferentes xiloses redutases no genoma das leveduras *Spathaspora*, que poderão contribuir para otimizar a produção de etanol de segunda geração.

**Palavras-chave:** Xilose, Xilose Redutase, Xilitol Desidrogenase



## ABSTRACT

The production of fuel alcohol has become important in recent years due to the future depletion of fossil fuels stocks and the environmental impact of pollutant emissions. An attractive source of raw material for ethanol production is the lignocellulosic biomass, composed of lignin, cellulose and hemicellulose. The sugar cane bagasse is an interesting source of cellulose and hemicellulose, that can be used in the fermentative process for fuel alcohol production. Although the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* efficiently ferments hexoses, this yeast is unable to ferment pentoses such as xylose present in hemicellulose hydrolysates. The enzyme xylose reductase (XR) is the first step in xylose metabolism, a NAD(P)H-dependent enzyme that reduces xylose to xylitol, but cofactor imbalance with the NAD<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase (the second enzyme in xylose metabolism) can lead to xylitol accumulation. Thus, screening for XR with high catalytic efficiency and dual cofactor affinity is important for increasing the ethanol productivity from xylose. This work, we have cloned xylose reductases from strains of *Spathaspora* (*S. passalidarum* and *S. arborariae*) and cloned xylitol dehydrogenase from *Spathaspora passalidarum*, which are natural xylose fermenting yeast. These genes were expressed in the *S. cerevisiae* strain CENPK2-1C to evaluate the enzymes functionality. Our results showed that a gene annotated in the *S. arborariae* genome (present in *S. passalidarum*) as xylose reductase does not have activity with this sugar, and probably is a putative aldoketo reductase of unknown specificity. Another gene was amplified from *S. arborariae* and *S. passalidarum*, and when these genes were expressed in *S. cerevisiae* a xylose reductase enzymatic activity with both NADH and NADPH were observed with the *S. arborariae* gene, but in the case of the *S. passalidarum* gene we obtained a NADPH-dependent xylose reductase activity. The activity of xylitol dehydrogenase expressed in *S. cerevisiae* was completely NAD<sup>+</sup>-dependent. *S. cerevisiae* recombinants, encoding the different enzymes of xylose metabolism, was able to grow on xylose with a xylose consumption, low yield of ethanol and significant xylitol production. It presumably due the low expression of xylitol dehydrogenase and increasing XR/XDH ratio activity. Indeed, in xylose batch fermentation the recombinant cells were able to produce more xylitol than ethanol and xylose/glucose batch fermentation, the recombinant cells produce more xylitol and acetate than ethanol from xylose, that probably indicating the cofactor imbalance determining the carbons from xylose

fate. Thus, our results indicate the presence of several different xylose reductases in the genome of *Spathaspora* yeast could be a contribution to optimize the second-generation ethanol.

.

**Keywords:** Xylose. Xylose Reductase. Xylitol Dehydrogenase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	19
Figura 2. Representação esquemática da hemicelulose.....	20
Figura 3. Rendimento fermentativo de etanol a partir de xilose e glicose das leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. ....	22
Figura 4. Fermentação de xilose por leveduras. ....	25
Figura 5. Estrutura cristalográfica da enzima xilose redutase da levedura <i>Candida tenuis</i> .....	32
Figura 6. Modelagem por homologia baseada na estrutura 3D da enzima xilitol desidrogenase da levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> . ....	35
Figura 7. Atividade da enzima xilose redutase e xilitol desidrogenase das leveduras do clado <i>Spathaspora</i> , isoladas da biodiversidade Brasileira. ....	49
Figura 8. Amplificação por PCR dos genes <i>XYL1</i> a partir de linhagens <i>S. arborariae</i> and <i>S. passalidarum</i> .. ....	52
Figura 9. Amplificação por PCR do gene, que codifica para a xilitol desidrogenase, a partir de linhagem <i>S. passalidarum</i> .....	53
Figura 10. Análise cinética da enzima xilose redutase de <i>S. arborariae</i> H.M. 19.1a expressa na levedura <i>S. cerevisiae</i> CENPK 2 1-C (AMY-4). ....	56
Figura 11. Análise cinética das enzimas xilose redutase de <i>S. passalidarum</i> HMD 1.3 expressa na levedura <i>S. cerevisiae</i> CENPK 2 1-C (AMY-2).....	58
Figura 12. Análise cinética das enzimas xilose redutase de <i>S. passalidarum</i> HMD 16.2 expressa na levedura <i>S. cerevisiae</i> CENPK 2 1-C (AMY-3). ....	59
Figura 13. Análise cinética da enzima xilitol desidrogenase de <i>S. passalidarum</i> HMD 16.2 expressa na levedura <i>S. cerevisiae</i> CENPK 2 1-C (AMY-5).. ....	61
Figura 14. Consumo de xilose e crescimento celular em <i>S. cerevisiae</i> CENPK 2-1C.....	64
Figura 15. Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol, xilitol, glicerol pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> AMY 2-6 durante o crescimento em glicose ou xilose.....	66
Figura 16. Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol, xilitol, glicerol em <i>S. cerevisiae</i> AMY 4-6, durante o crescimento em glicose ou xilose.. ....	67
Figura 17. Fermentação em batelada contendo 20 g/L de xilose pelas linhagens de leveduras modificadas. ....	69

Figura 18. Co-fermentação em batelada contendo 20 g/L de glicose 20 g/L de xilose pelas linhagens de leveduras modificadas.....	71
Figura 19. Filograma das sequências da aldo/ceto redutase (AR) putativa de <i>S. arborariae</i> , com xilose redutases (XR) clonadas neste trabalho de <i>S. arborariae</i> e <i>S. passalidarum</i> (linhagens HMD 1.3 e HMD 16.2), e as XRs de outras espécies do clado <i>Spathaspora</i> e das leveduras <i>S. stiptis</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	75
Figura 20. Alinhamento das sequências da aldo/ceto redutase (AR) putativa de <i>S. arborariae</i> , xilose redutases (XR) de <i>S. passalidarum</i> (XYL1.2) e as clonadas das linhagens HMD1.3 e HMD16.2, a XR clonada de <i>S. arborariae</i> , e a XR putativa de <i>S. roraimenenses</i> .....	76
Figura 21. Filograma das sequências de xilitol desidrogenase de <i>K. marxianus</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>C. tenuis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. stiptis</i> , <i>S. passalidarum</i> (incluindo aa clonada a partir da linhagem HMD 16.2), e de outras espécies do clado <i>Spathaspora</i> .....	80
Figura 22. Alinhamento das sequências de XDHs de <i>D. hansenii</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. stiptis</i> , <i>S. passalidarum</i> HMD 16.2 e <i>S. passalidarum</i> (XYL2.1 e XYL2.2).....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas.....	37
Tabela 2 – Primers usados neste estudo.....	41
Tabela 3 – Plasmídeos utilizados neste estudo.....	43
Tabela 4 – Atividade específica de XR em leveduras.....	50
Tabela 5 – Análise cinética das enzimas XR e XDH das linhagens <i>S. passalidarum</i> e <i>S. arborariae</i> .....	55
Tabela 6 – Atividade específica de XDH em leveduras.....	60
Tabela 7 – Análise cinética das enzimas XR e XDH clonadas e expressas em <i>S. cerevisiae</i> .....	62
Tabela 8 – Atividade específica de XR e XDH em leveduras.....	63
Tabela 9 – Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em xilose pelas linhagens transformantes <i>S. cerevisiae</i> .....	68
Tabela 10 – Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em batelada em xilose pelas linhagens transformantes <i>S. cerevisiae</i> .....	70
Tabela 11 – Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em batelada em xilose e glicose pelas linhagens transformantes <i>S. cerevisiae</i> .....	72



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL E A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	17
1.2 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE.....	21
1.3 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE .....	23
1.4 ESTRUTURA DA ENZIMA XILOSE REDUTASE .....	29
1.5 ESTRUTURA DA ENZIMA XILITOL DESIDROGENASE .....	33
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	37
3.2 CULTIVOS CELULARES .....	39
3.2.1. Condições de cultivo.....	39
3.2.2. Fermentação em batelada.....	39
3.2.3. Determinações bioquímicas .....	40
3.3 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	40
3.3.1. Clonagem dos genes de interesse.....	40
3.3.2. Transformação de leveduras .....	43
3.3.3. Sobre-expressão do gene <i>XKS1</i> por recombinação homóloga.....	44
3.3.5 Sequenciamento dos genes codificantes para xilose redutase e xilitol desidrogenases clonados.....	44
3.3.6 Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	45
3.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	45
3.4.1 Determinação da atividade da enzima xilose redutase.....	46
3.4.2 Determinação da atividade da enzima xilitol desidrogenase ..	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE EM LEVEDURAS <i>SPATHASPORA</i> .....	48
4.2 CLONAGEM DE GENES EM LINHAGEM DE LABORATÓRIO <i>S. CEREVISIAE</i> .....	51
4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES CODIFICANTES PARA XILOSE REDUTASES E XILITOL DESIDROGENASE.....	53
4.4 ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE EM <i>S. CEREVISIAE</i> RECOMBINANTES. ....	54
4.5 CRESCIMENTO CELULAR E FERMENTAÇÕES EM BATELADA DAS LINHAGENS TRANSFORMANTES. ....	63

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>112</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL E A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O futuro esgotamento das reservas de combustíveis fósseis não renováveis no mundo, o aumento do preço do petróleo e seu impacto negativo no meio ambiente, tem estimulado a necessidade de desenvolver uma alternativa de combustível renovável para a sociedade. A produção de álcool combustível no Brasil e no mundo tem se tornado de fundamental importância no cenário socioeconômico e ambiental, e muitos avanços tecnológicos nesse setor tem surgido com a finalidade de se obter um combustível ambientalmente correto e competitivo com a gasolina (Goldemberg, 2007; 2008; Carioca, 2010).

Em 2010, Brasil e Estados Unidos, os maiores produtores de etanol do mundo, produziram 86 bilhões de litros de etanol, correspondendo a 90% da produção mundial. No Brasil, a produção de etanol total foi de 23,64 bilhões de litros de etanol a partir de 588,92 milhões de toneladas cana de açúcar cultivada em ~ 8,5 mil hectares na safra de 2012/13. Na safra de 2014/15 a produção de etanol no país consolidou-se em 28,66 bilhões de litros e 30,5 bilhões de litros para a safra de 2015/16, um aumento de 1,84 bilhões de litros, ou 6,1 % em relação ao ano anterior (CONAB, 2013; CONAB, 2015; CONAB, 2016, Buijs et al. 2013).

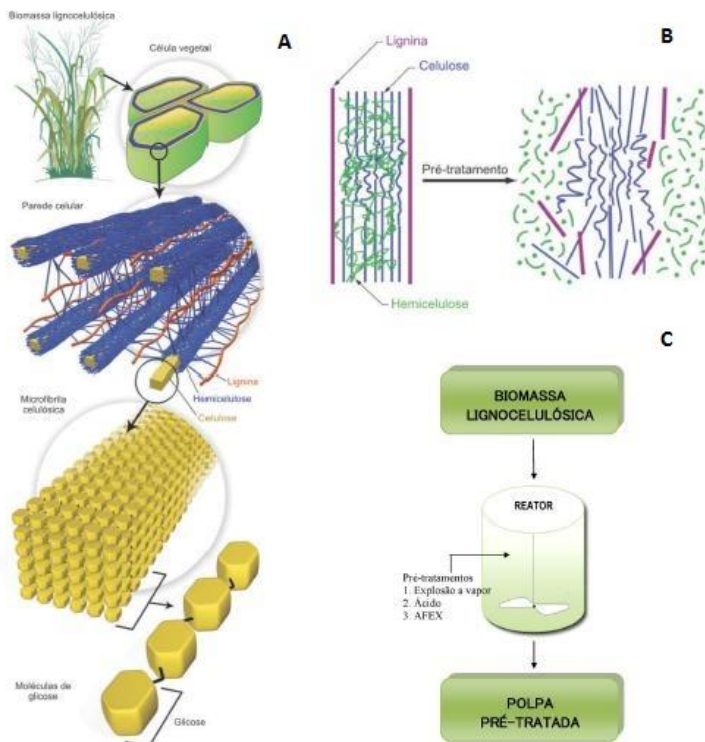
O suco da cana de açúcar pode ser diretamente fermentado para a produção de etanol, ou ser usado na produção de açúcar, dependendo de qual produto apresenta preço mais favorável. A partir de cada tonelada de cana de açúcar produzida é gerado entre 270-280 Kg de bagaço de cana de açúcar e como consequência, ~186 milhões de toneladas de bagaço serão produzidos anualmente, e embora parte deste bagaço seja utilizado na geração de energia e eletricidade para a própria usina, grande parte dele acaba não sendo utilizado (CONAB, 2016; Soccol et al., 2010, Stambuk et al., 2008). O desenvolvimento dessa tecnologia a partir do bagaço da cana no Brasil é favorecido pelo fato do processo de produção poder ser incorporado às unidades produtoras de açúcar/etanol, exigindo menores investimentos de infra-estrutura e logística (Soccol et al., 2010).

Além do bagaço de cana de açúcar gerado no cultivo brasileiro, a cada ano uma enorme quantidade de material vegetal não comestível, incluindo palhas de milho e trigo, restos de madeira, etc. são produzidos e geralmente descartados no ambiente. A transformação desses resíduos

agrícolas que não serão utilizados para a alimentação, em etanol de segunda geração, tem se mostrado bastante atrativa (Sanderson, 2011). Ao considerar o balanço de massa da cana de açúcar, é possível perceber que a lignocelulose poderia gerar 50% de etanol a mais em relação a produção atualmente obtida de álcool combustível (Stambuk et al., 2008). Segundo Zhang (2008), um bilhão de toneladas de biomassa seca produziria entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico.

A biomassa lignocelulósica é o maior componente estrutural de plantas lenhosas e não lenhosas, e representa a maior fonte de matéria orgânica renovável. As propriedades químicas dos componentes dessa biomassa fazem dela um substrato de alto valor biotecnológico e enormes quantidades de resíduos de lignocelulose são gerados através de práticas florestais e de agricultura, indústrias de papéis, madeira e muitas outras agro-indústrias (Howard et al. 2003). A lignocelulose consiste de três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1A). A celulose, o maior constituinte das plantas e a mais abundante molécula do planeta, é um polímero linear de glicose, conectadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. A hemicelulose, o segundo maior componente da biomassa lignocelulósica, é um polímero heterogêneo de pentoses (incluindo xilose e arabinose) e hexoses (principalmente manoses e pouca glicose e galactose). A composição da hemicelulose é muito variável na natureza e depende da planta analisada. A lignina, o terceiro maior polímero heterogêneo da lignocelulose, contém três álcoois aromáticos e atua como uma barreira física por ligar-se tanto a hemicelulose quanto a celulose (Anderson & Akin, 2008; Dashtban et al., 2009).

A biomassa presente no bagaço da cana, herbáceos e madeira em geral consiste de 40-55% de celulose, 25-50% de hemicelulose e 19-40% de lignina. Enquanto a celulose e hemicelulose podem ser usadas em larga escala para a obtenção de biocombustíveis, a lignina pode ser usada em outros processos biotecnológicos, ou até ser queimada para a produção de calor e eletricidade. A hidrólise da biomassa lignocelulósica geralmente envolve um pré-tratamento (mecânico, térmico e/ou químico), onde a estrutura da biomassa é afrouxada de forma a liberar as longas cadeias de polissacarídeos (Figura 1B e C), e a hidrólise subsequente destes polissacarídeos por métodos químicos ou enzimáticos, sendo estes últimos os preferidos por não produzirem compostos tóxicos que inibem a fermentação, evitam corrosão de equipamentos, além de não exigirem uma posterior etapa de neutralização (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar et al., 2008; Dashtban et al., 2009; Stambuk et al. 2008).

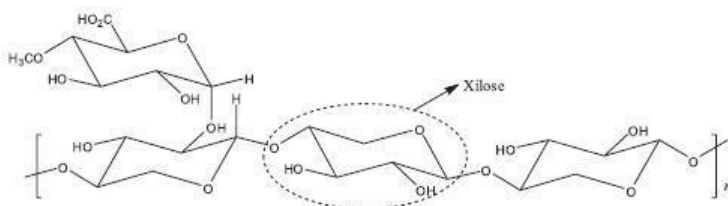


**Figura 1. Estrutura e pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.** (A) Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica. (B) Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina provocadas pelo pré-tratamento. (C) Representação esquemática dos pré-tratamentos: (1) explosão a vapor, (2) ácido e (3) AFEX (amônia líquida). Modificado de Santos et al. (2012).

Ao considerar a hidrólise enzimática, a celulose é degradada pela ação sinérgica de três enzimas do complexo celulase: as endoglucanases, as exoglucanases e as  $\beta$ -glicosidases. As endoglucanases iniciam um ataque randômico em múltiplos locais internos de regiões amorfas da fibra celulósica, produzindo celodextrinas e portanto, abrindo locais para o subsequente ataque pelas celobiohidrolases. Estas enzimas, também chamadas de exoglucanases, são o maior componente do sistema de celulasas fúngicas e podem também eventualmente hidrolisar estruturas cristalinas. As celobiohidrolases removem mono (glicose) e dímeros (celobiose) do final da cadeia de celulose e celodextrinas. Geralmente,

as endoglucanases e celobiohidrolases trabalham sinérgicamente na hidrólise da celulose, mas são fortemente inibidas pelos produtos de degradação, glicose e celobiose (Howard et al., 2003; Bezerra & Dias, 2005). As  $\beta$ -glicosidases, por sua vez, quebram a celobiose gerando glicose, porém também são inibidas pelo seu produto (Bansal et al., 2009). Enquanto as duas primeiras enzimas são encontradas em fungos celulolíticos, a  $\beta$ -glicosidase também pode ser encontrada em leveduras.

O mais relevante e abundante componente da hemicelulose, as xilanas (polímeros de xilose, vide Figura 2), são o principal componente das paredes celulares secundárias constituindo 20-30% da biomassa de plantas lenhosas e herbáceas, e em alguns tecidos de gramas e cereais até 50% (revisto por Gírio et al. 2010).



**Figura 2. Representação esquemática da hemicelulose.** Modificado de Santos et al. (2012).

Diferentes enzimas são necessárias para hidrolisar as hemiceluloses, devido a sua heterogeneidade. Xilanases são capazes de hidrolisar ligações  $\beta$ -1,4 das xilanas e produzir oligômeros menores, os quais poderão ser hidrolizados a xilose pelas  $\beta$ -xilosidases (Dashtban *et al.* 2009), liberando resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosídeo a partir de terminações não redutoras. Fungos filamentosos são interessantes produtores de xilanases uma vez que estes excretam as enzimas no meio em quantidades muito maiores quando comparadas com leveduras e bactérias (revisto por Gírio et al. 2010). Glicosídeo Hidrolases (GH) são uma família de proteínas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois resíduos de carboidratos, dos quais muitos membros da sub-família GH-43, são  $\beta$ -xilosidades, sendo estas enzimas encontradas em bactérias, fungos filamentosos e plantas (Barker et al., 2010). Lara et al (2014) demonstrou que novos isolados de levedura como *Candida tropicalis*, *Scheffersomyces shehatae* (antigamente denominada *Candida shehatae*), *Sugiyamaella smithiae* possuem atividades de xilanases e  $\beta$ -xilosidades. A levedura *Scheffersomyces*

*stipitis* (antigamente denominada *Pichia stipitis*) também possui atividade  $\beta$ -xilânase, além de outras enzimas que atuam em xilanas, e foram identificadas através do sequenciamento do seu genoma (revisto por Jeffries et al., 2009).

## 1.2 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE

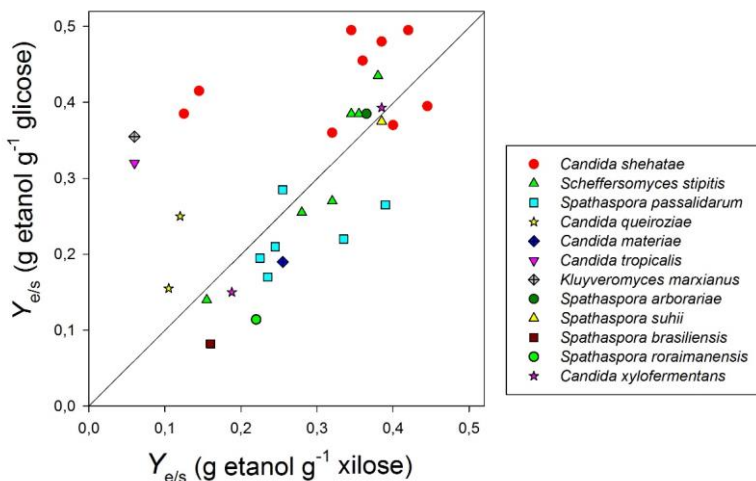
Para produzir etanol a partir da matéria lignocelulósica economicamente, é essencial ter um biocatalisador capaz de fermentar hexoses e pentoses sob as condições adversas do ambiente industrial. A levedura *S. cerevisiae*, utilizada com sucesso na produção industrial de etanol a partir da cana de açúcar e melaço no Brasil, é capaz de fermentar hexoses rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação. Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar celobiose e pentoses como a xilose, que estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados da biomassa lignocelulósica (Harner et al., 2015; Cai, et al., 2012).

A habilidade de leveduras em fermentar xilose tem sido descrita desde os anos 80. Em 1983, du Preez e colaboradores descreveram *S. shehatae* como uma levedura fermentadora de xilose. Desde então, os organismos mais estudados tem sido *Pachysolen tannophilus*, *S. shehatae*, *Candida tropicalis*, e principalmente *S. stipitis*. Muitas espécies tem a capacidade de metabolizar xilose, mas somente ~1% são capazes de fermentar este açúcar (Jeffries et al., 1994; Hahn-Hagërdal et al. 2007; Toivola et al. 1984; Bolen and Detroy, 1985).

Nos últimos anos foram descritas novas espécies do clado *Spathaspora*, como *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora allomyrinae*, *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans*, que são capazes de produzir etanol a partir de xilose (Nguyen, et al, 2006; Cadete et al, 2009; Cadete et al. 2013; Wang et al., 2016). As espécies *Candida insectamans*, *Candida jeffriesii*, *Candida lyxosophila*, *Candida materiae* e *Candida subhashii* também pertencem ao clado *Spathaspora* e também estão associadas a substratos de madeira e insetos (Barbosa et al. 2009; Lachance et al. 2011; Nguyen et al. 2011). Dentre estas, destacam-se as espécies *Spathaspora passalidarum*, uma levedura isolada do intestino de besouros presentes em madeira (Nguyen, et al. 2006) e *S. arborariae*, uma levedura isolada a partir de madeira em decomposição em duas diferentes localidades do Brasil (Cadete et al., 2009). Estas leveduras, pertencentes ao clado CTG, são

rotineiramente considerados produtores de enzimas industriais para setores como o do bioetanol. Este clado corresponde a um restrito grupo de ascomicetos, neste grupo, o códon universal para o aminoácido leucina é traduzido para o aminoácido serina (Papon et al. 2014). Recentemente foi demonstrado que a levedura fermentadora de xilose *S. arborariae* também é tolerante a inibidores decorrentes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como o furfural e hidroximetilfurfural (da Cunha-Pereira et al., 2011).

Resultados de rendimento de fermentação ( $Y_{e/s}$ , g etanol/g açúcar) obtidos por diferentes leveduras quando utilizaram glicose ou xilose como fonte de carbono para o crescimento, revelou que as leveduras do clado *Spathaspora*, não só apresentam bons rendimentos como apresentam melhor produção de etanol a partir de xilose, em relação a glicose, com destaque para as linhagens analisadas de *S. passalidarum* que apresentou melhores rendimentos de etanol a partir de xilose (Mouro, 2012) (Figura 3).



**Figura 3. Rendimento fermentativo de etanol a partir de xilose e glicose das leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. (Mouro, 2012)**

Linhagens destas duas leveduras do gênero *Spathaspora* (*S. arborariae* e *S. passalidarum*) tem se mostrado eficientes fermentadoras de glicose e xilose, com rápido consumo de ambos os açúcares (Mouro, 2012), sendo que as leveduras da espécie *Spathaspora passalidarum*,

além de consumirem simultaneamente hexoses e pentoses, também são capazes de consumir celobiose. A habilidade de fermentar xilose mais rápido que glicose e simultaneamente cometabolizar glicose, xilose e celobiose, tem se mostrado uma propriedade desta levedura sem precedentes (Longe et al., 2012; Jeffries et al., 2013).

### 1.3 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE

Como qualquer outro açúcar, a captação de pentoses pelas células exige proteínas transportadoras de membrana, e este é considerado um fator limitante para a fermentação de pentoses de maneira geral. Nas leveduras utilizadoras de xilose o transporte de xilose ocorre por um mecanismo de difusão facilitada, no qual o gradiente do açúcar é a única força direcionadora, ou através de um sistema de transporte ativo, usualmente por co-transporte (simporte)  $H^+$ -açúcar. O sistema de transporte de difusão facilitada é usualmente um transporte de baixa afinidade, enquanto que o componente de alta afinidade são os simportes de prótons que usam a força próton motriz para transportar ativamente o açúcar para dentro das células. Estes diferentes sistemas de transporte são fortemente regulados pela concentração de substrato extracelular. Naturalmente em leveduras fermentadoras de xilose, é comum que diferentes sistemas de transportes sejam usados em diferentes condições (Kilian et al., 1993; Hahn-Hagerdal et al., 2007; Leandro et al., 2009; revisito por Stambuk et al., 2008).

A xilose é também transportada por transportadores de hexoses de alta e intermediária afinidade em *S. cerevisiae*. O sistema de transporte de difusão facilitada é baseado em um grande número de permeases, sendo estes 18 na levedura *S. cerevisiae*, denominada transportadores *HXT1-HXT17* e *GAL2*. Entretanto, a afinidade de transportadores de hexose para xilose é de uma a duas ordens de grandeza menor do que a afinidade por glicose, sendo que a competição com a glicose restringe fortemente a assimilação de xilose (Saloheimo et al., 2007; Kotter et al., 1993; Hahn-Hagerdal et al., 2007).

Os genes que codificam os transportadores de hexoses *HXT* tem sido individualmente sobre-expressos em *S. cerevisiae* com diferentes backgrounds e estes estudos mostram que os transportadores *HXT1*, *HXT2* e *HXT7* são os transportadores mais envolvidos com o consumo da xilose, embora *HXT7* mostra uma clara preferência para glicose (Gonçalves et al. 2014; Tanino et al 2012). Por outro lado, Hamacher et

al. (2002) mostrou também que dos 18 transportadores de hexoses, os transportadores *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *GAL2* estão mais envolvidos com o transporte da xilose, ou seja, são capazes de transportar a xilose em quantidades mais significativas, embora nesse estudo o transportador *HXT2* não tenha sido avaliado.

As leveduras das espécies *S. stiptis* e *S. shehatae* possuem os dois sistemas de transportes (simporte de prótons e difusão facilitada), sendo que a *S. stiptis* é capaz de transportar xilose melhor que *S. shehatae*, mas o transporte de glicose mostra ser melhor que xilose para ambas as leveduras (revisto por Hahn-Hägerdal et al. 1994). A levedura *S. stiptis* apresenta em seu genoma possíveis genes candidatos a transportadores de xilose (revisto por Jojima et al., 2010), e nos últimos anos muitos transportadores de xilose têm sido expressos em *S. cerevisiae* mostrando significativas melhoras no seu desempenho fermentativo, como os transportadores *SUT1*, *XUT1*, *HXT2.6*, *QUP2* e *XUT3* de *S. stiptis*, *At5g59250* e *At5g17101* de *Arabidopsis thaliana*, *DEHA0D02167* e *XylHP* de *Debaryomyces hansenii* (Young et al, 2011; Sales et al., 2015), *XUT4*, *XUT5*, *XUT6*, *XUT7*, *RGT2* e *SUT4* de *S. stiptis* (Moon et al., 2013), *An25* de *Neurospora crassa* (Du et al, 2010), *SUT1* de *S. passalidarum* (Sales, 2015) e os genes *GXS1* e *GXF1* de *Candida intermédia* (Leandro et al. 2009). A levedura *Spathaspora arborariae* fermenta eficientemente a xilose por apresentar um sistema de co-transporte de  $H^+$ -xilose de alta capacidade, o que deve contribuir para a sua performance fermentativa já que o transporte é considerado o fator limitante no metabolismo da xilose. A linhagem de *S. arborariae* difere destas leveduras por possuir um transporte ativo de xilose com relativa baixa afinidade pelo substrato, quando comparado ao transporte ativo de glicose pelas mesmas células (Mouro, 2012).

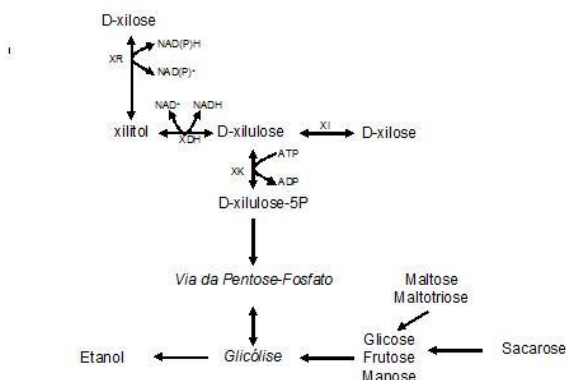
Com base nos dados de que a levedura *S. passalidarum* exhibe consumo simultâneo de glicose e xilose sob condições aeróbicas, enquanto que sob condições anaeróbicas ocorre consumo sequencial de glicose e xilose, foi sugerido que esta levedura possivelmente apresente dois diferentes sistemas de transporte, o simporte de prótons em aerobiose e a difusão facilitada em anaerobiose (Hou, 2012). O mesmo padrão foi observado na levedura *K. marxianus*, visto que esta levedura somente apresentou transporte ativo de alta afinidade em condições aeróbicas, enquanto que em condições microaeróbicas a xilose foi captada por um sistema de transporte de difusão facilitada com baixa afinidade (Stambuk et al., 2003).

As leveduras fermentadoras de xilose permitiram também estudar e caracterizar as enzimas e genes necessários à metabolização



deste açúcar. Em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariontes, a metabolização da xilose procede através de dois passos de redução e oxidação (Figura 4), os quais são mediados pela xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), transformando a xilose em xilitol e posteriormente em xilulose. Assim a xilose entra para a via da pentose fosfato (PPP) através da xilulose, que pela xilulocinase (XK) é fosforilada a xilulose-5P. A PPP é considerada como tendo duas fases. A fase oxidativa converte a hexose, glicose-6P, para a pentose ribulose-5P, produzindo  $\text{CO}_2$  e NADPH. A fase não oxidativa converte ribulose-5P em ribose-5P, xilulose-5P, sedoheptulose 7P e eritrose 4P, que finalmente através da frutose-6P e gliceraldeído-3P, retornam os carbonos para a glicólise, permitindo a posterior fermentação do açúcar até etanol.

As leveduras fermentadoras de xilose, entretanto, não demonstram o mesmo desempenho fermentativo do que a levedura *S. cerevisiae* em condições industriais, pois a utilização em larga escala destas leveduras é dificultada pela sua baixa tolerância ao etanol, ao baixo pH e aos inibidores de hidrolisados, exigindo condições microaeróbicas (revisto por Steensels et al., 2014). Enquanto *S. cerevisiae* naturalmente é capaz de fermentar xilulose, embora na ordem de 10 vezes menos quando comparado com a glicose e possui genes para a utilização de xilose, que codificam às enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, estes são expressos em baixos níveis, não suportando o crescimento em xilose (revisto por Hahn-Hagerdal et al. 2007).



**Figura 4. Fermentação de xilose por leveduras.** O esquema mostra as duas possíveis vias pelas quais a xilose pode ser convertida a xilulose, e assim ser fermentada pelas células.

A enzima xilose redutase de algumas leveduras exibe uma estrita dependência pelo cofator NADPH, liberando  $\text{NADP}^+$ , enquanto outras podem ter atividade tanto com NADPH como de NADH, liberando tanto  $\text{NADP}^+$  ou  $\text{NAD}^+$ , respectivamente (Jeffries, 1990; revisto por Lee, 1998). Em seguida, a enzima xilitol desidrogenase, utiliza como substrato estritamente  $\text{NAD}^+$ , liberando NADH. Esta estrita especificidade da enzima xilitol desidrogenase é um fator limitante na fermentação da xilose, pois causa um desbalanço de cofatores, resultando em um acúmulo de xilitol (Rizzi, et al., 1989), além da formação de glicerol, pela glicerol-3-fosfato desidrogenase, uma vez que o NADH produzido não pode ser reoxidado suficientemente pela cadeia respiratória, sob condições limitadas de oxigênio, prejudicando a produção de etanol, (Matsushika et al, 2009; Ansel et al., 1997). Embora a enzima XR tenha como substrato a xilose, açúcares como ribose, galactose, arabinose e glicose também podem ser utilizados como substrato, porém com menor eficiência (Zhang et al., 2009; Wang et al., 2007; Lee, 1998; Lee et al., 2003). Da mesma forma, vários estudos demonstram que a enzima xilitol desidrogenase é capaz de utilizar como substrato outros polióis além do xilitol, como sorbitol e manitol (Lulu et al., 2013; Biswas et al., 2013; Person et al., 1993).

Sob condições anaeróbicas, as diferentes coenzimas utilizadas pela xilose redutase e xilitol desidrogenase causam um desbalanço de cofatores ainda maior, que resulta em um acúmulo considerável de xilitol como bioproduto, pois enquanto  $\text{NADP}^+$  não pode ser reduzido pela fase oxidativa da via das pentoses fosfatos e o NADH não pode ser oxidado na ausência de oxigênio pela cadeia respiratória, reduzindo a produção de etanol e aumentando a produção de xilitol. Para contornar este problema, acaba sendo necessário um ambiente em condições limitadas de oxigênio, inviabilizando seu uso em fermentações industriais de grande porte, principalmente durante a fermentação de matéria seca de lignocelulose, uma vez que a introdução de ar neste meio acaba sendo desigual. O uso da enzima xilose redutase, que tenha atividade com ambos os cofatores (NADPH ou NADH), também pode aliviar o desbalanço de cofatores e permitir a produção de etanol em condições anaeróbicas (Jeffries, 2006; Hahn-Hängerdal et al. 1994; Hou, 2012; Santos et al., 2012).

A enzima xilose redutase codificada pelo gene *XYLI* da levedura *Candida parapsilosis* é a primeira xilose redutase relatada com preferência pelo NADH ( $K_m$  3,3  $\mu\text{M}_{\text{NADH}}$  e  $K_m$  36,5  $\mu\text{M}_{\text{NADPH}}$ ) (Lee et al., 2003). O gene *XYLI* possui em sua sequência uma arginina no lugar

da lisina no motivo Ile-Pro-Lys-Ser, que é conservado entre as xiloses redutases dependentes de NADPH, sendo esta considerada uma das causas pela preferência por NADH por parte da enzima xilose redutase de *C. parapsilopsis* (Lee, 1998; Lee et al., 2003). Alguns trabalhos, como os de Bengtsson et al. (2009) e Weyda et al. (2014) mostraram que por técnica de mutagênese sítio dirigida, a substituição da lisina pela arginina nos mutantes K270R da xilose redutase da *S. stipitis* e do fungo filamentosos *Arpergillus carbonarius*, mimetizando a xilose redutase da levedura *C. parapsilosis*, proporcionou uma maior utilização do cofator NADH e com isso maior consumo de xilose e maior produção de etanol (além de menor produção de glicerol) em *S. stipitis*, e maior produção de ácido cítrico em *A. carbonarius*.

Hou (2012) mostrou que a levedura *S. passalidarum* exibiu uma xilose redutase com afinidade maior para NADH, além de converter xilose a etanol, em condições anaeróbicas, com muito mais eficiência que a *S. stipitis* (acima de 90% da produção máxima teórica), e com menor produção de xilitol. Esta levedura também foi capaz, em condições aeróbicas, de consumir simultaneamente xilose e glicose.

Da mesma forma que xilose redutases dependentes de NADH contornam o problema do desbalanço de cofatores, o uso de xilitol desidrogenases mutantes (obtidas por mutagênese sítio dirigida) dependentes de NADP<sup>+</sup> também melhora a fermentação de xilose por leveduras, produzindo menos xilitol (Watanabe et al., 2007; Matsushika et al., 2008a; 2008b; 2009a, 2009b). Outra tentativa visando a produção de menos xilitol, foi a sobreexpressão do gene *GDP1*, que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> da levedura *Kluyveromyces lactis* em *S. cerevisiae* (Verho et al, 2003), como também a sobre-expressão de oxidases dependentes de NADH formadoras de água em *S. cerevisiae*, através de uma NADH oxidase codificada pelo gene *noxE* de *Lactococcus latic*. Esta NADH oxidase especificamente usa o NADH excedente, fornecendo uma rota alternativa para a sua oxidação, acompanhada pela formação de água, quando houver oxigênio disponível (Zang et al., 2012).

Através de engenharia genética, a via de utilização de xilose inserindo genes que codificam a xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *S. stipitis*, e aumentando a expressão da xilulocinase endógena codificada pelo gene *XKS1*, além do incremento na expressão de enzimas da via da pentose fosfato (Kotter et al., 1993; Zha et al, 2014; Hasunuma et al., 2014; Walfridsson et al., 1995), permitiu desenvolver leveduras de *S. cerevisiae* capazes de fermentar esta pentose (Matsushika et al., 2009; Xiong, 2011; Eliasson et al., 2000;

Toivari et al., 2001).

O nível da expressão das enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase tem sido também investigado, onde a expressão ajustada dessas enzimas em *S. cerevisiae* melhora a fermentação de xilose a etanol. Matsushika & Sawayama (2008) mostraram que a alta razão de XR/XDH aumenta a produção de etanol e a diminuição de xilitol, quando a atividade da XK se encontra em nível moderado, visto que, o excesso de atividade de XK, pode levar ao acúmulo de xilulose-5-fosfato e a depleção de ATP na célula. Outro estudo também mostra o efeito no aumento da expressão de *XYL1* e a correspondente mudança na razão XR/XDH na fermentação de xilose em *S. cerevisiae*, necessário para o rápida captação, metabolismo e fermentação desse açúcar (Zha et al, 2012). Entretanto existem algumas discrepâncias em relação a razão XR/XDH, pois outros trabalhos mostram que a baixa razão de XR/XDH promovem a diminuição do acúmulo de xilitol (Eliasson et al., 2001; Walfridsson et al., 1997; Kim et al., 2012; Kim et al., 2013; Tamakawa et al., 2013).

Em uma segunda via metabólica (vide Figura 3), a xilose pode ser isomerizada diretamente a xilulose, reação catalisada pela enzima xilose isomerase (XI). Esta via, que não produz xilitol, é funcional na maioria dos procariotos (ex. *Escherichia coli*, *Streptomyces* sp, *Clostridium phytofermentans*), em alguns fungos (ex. *Piromyces*, *Orpinomyces*), e plantas (ex. *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*), mas até o presente não foi descrita em leveduras (Madhavan et al., 2009; Maehava et al., 2013; Karhumaa et al., 2007; Zhou et al., 2012; Dun et al., 2012; Kristo et al., 1996; Ma et al., 2012).

Estudos que expressaram a xilose isomerase em *S. cerevisiae* tem mostrado progresso em relação a produção de etanol e atividade da enzima, porém os resultados mostram que essa produtividade de etanol não se mostra superior aos trabalhos de clonagem e expressão de XR e XDH em *S. cerevisiae*, sobretudo demonstrando acúmulo de xilitol, devido a presença de uma aldose redutase não específica, em *S. cerevisiae*, codificada pelo gene *GRE3*, que funciona como uma xilose redutase dependente de NADPH, contribuindo então, para a formação de xilitol. Embora a expressão da enzima xilose isomerase não deixe de ser uma alternativa interessante, Ma et al (2012) observou que quando expresso o gene *YXI* da bactéria *C. phytofermentans* em *S. cerevisiae*, houve considerável produção de xilitol que foi atribuída a catálise pela aldose redutase não específica, codificada pelo gene *GRE3*. Uma vez que *GRE3* está envolvido na tolerância da levedura à detoxificação de inibidores produzidos no pré-tratamento, funcionando com uma aldose

redutase que também converte hidroximetil-furfural e furfural em furano-metanol e furano-di-metanol, a deleção deste gene poderia afetar o potencial de tolerância ao stress e a habilidade de detoxificação da levedura (Liu et al., 2008). Outros trabalhos mostram que a produtividade de etanol é muito baixa em leveduras que apresentam este gene (Brat et al., 2009; Tanino et al., 2010). Contudo, acaba sendo difícil afirmar que a via da xilose isomerase é superior a via XR-XDH em *S. cerevisiae*, uma vez que a via XR-XDH permite maior crescimento em condições aeróbicas e maior consumo de xilose em condições anaeróbicas. (Karhumaa et al., 2007).

Além das modificações nestes genes principais do metabolismo da xilose, outros estudos envolvendo outros genes, vêm sendo realizados com o objetivo de melhorar a fermentação deste açúcar. A deleção do gene *ALD6*, que codifica a enzima aldeído desidrogenase, responsável pela produção de acetato a partir de acetaldeído (dependente do substrato NADP<sup>+</sup>), melhorou o consumo de xilose e a produção de etanol, visto que o acetaldeído é um substrato para a produção de etanol. A deleção do gene *ALD6* torna-se interessante, uma vez que essa via da enzima aldeído desidrogenase acaba sendo alimentada pelo NADP<sup>+</sup> produzido pela enzima xilose redutase. O mesmo efeito positivo foi visto com a sobre-expressão do gene *TAL1*, que codifica para a transaldolase, uma enzima chave da via das pentoses fosfato (Lee et al., 2012). Foi demonstrado que a super-expressão das 4 enzimas da via não oxidativa da pentose fosfato (*TAL1/TKL1/RPE1/RKII*) de *S. cerevisiae*, pode melhorar a produção de etanol e diminuir a produção de xilitol (Xiong et al., 2013; Xiong et al., 2014).

Muitos estudos de clonagem e expressão dessas enzimas do metabolismo da xilose são feitos em leveduras de laboratório e entre essas *S. cerevisiae*, a levedura de laboratório CENPK é utilizada com grande aceitação para estudos de engenharia metabólica (Johansson et al., 2001; Karhumaa et al., 2005; Konishi et al. 2015; Entian & Kotter, 1998), além de apresentar crescimento ótimo em várias fontes de carbono, e esporular eficientemente (Entian & Kotter, 1998).

#### 1.4 ESTRUTURA DA ENZIMA XILOSE REDUTASE

A enzima xilose redutase pertence à família das Aldo-ceto redutases (EC 1.1.1.21), cujos membros catalisam a redução NAD(P)H dependente e reversível de aldeídos e cetonas a álcoois correspondentes. Esta enzima se encontra no citoplasma de muitas leveduras fermentadoras ou utilizadoras de xilose, onde catalisa o primeiro passo

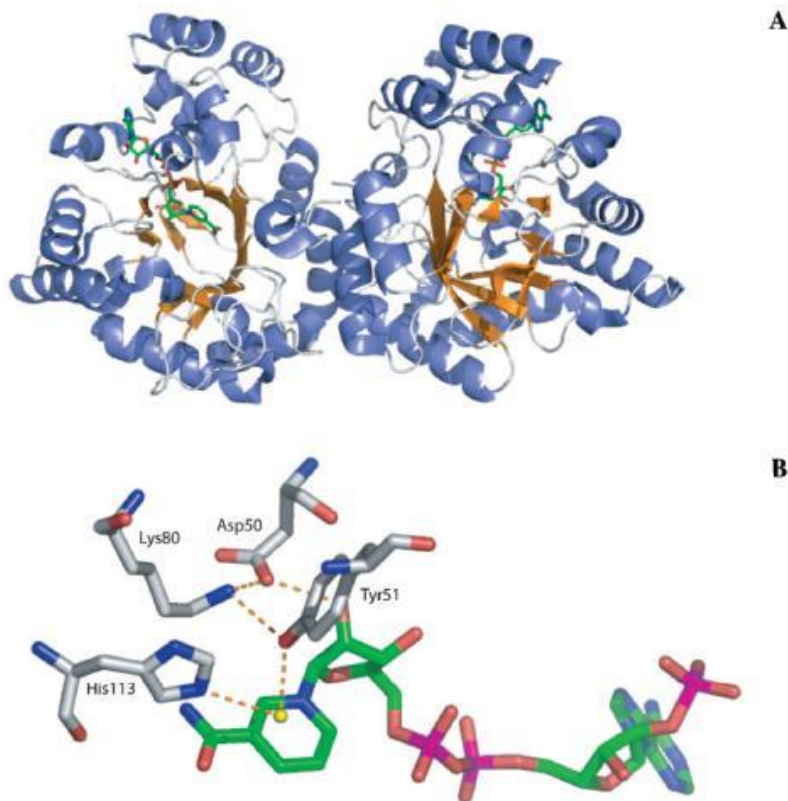
do metabolismo da xilose e é essencial para o crescimento e utilização da xilose por leveduras (Klimacel et al., 2001; Lee, 1998.)

Embora a família Aldo-ceto redutase tenha na sua maioria membros monoméricos, xilose redutases das leveduras *S. stiptis* (Wang et al. 2007), *Neurospora crassa* (Woodyer et al., 2005), *Candida tropicalis* (Yokoyama et al., 1995) e *Candida tenuis* (Kratzer et al, 2006) apresentam estrutura dimérica com subunidades idênticas de barril  $\beta/\alpha$ , com segmentos  $\alpha$  e  $\beta$  intercalados (Figura 5A), com peso molecular por volta de 33 a 40 kDa (Kostrzynska et al., 1998). O gene *XYL1*, que codifica à enzima xilose redutase da levedura *S. stiptis*, é uma ORF (open reading frame) de 954 pb que permite a síntese de uma proteína com 318 aminoácidos (Hallborn et al, 1991). Similarmente, o gene da xilose redutase de *C. tropicalis* apresenta uma ORF de 972 bp codificando para uma proteína de 324 aminoácidos (Yokohama et al, 1995).

Estudos mostram que todos os resíduos importantes que são conhecidos em participar diretamente da catálise ou ligação do cofator na aldose redutase humana (Asp<sup>43</sup>, Tyr<sup>48</sup>, Lys<sup>77</sup> e His<sup>110</sup>) são estritamente conservados em xilose redutases de leveduras, formando a tétrade catalítica (Figura 5B), onde a tirosina atua como um catalisador ácido-básico (doador de próton durante a redução de aldeído) e o Aspartato, Lisina e Histidina funcionam como um importante facilitador de transferência híbrida, com o aminoácido lisina funcionando como um importante facilitador com pontes de hidrogênio que estabilizam a tirosina, que por ser vez é estabilizada pela asparagina, enquanto que a histidina foi postulada em orientar o substrato ao sítio ativo. Entretanto, outros resíduos (Trp<sup>20</sup>, Val<sup>47</sup>, Trp<sup>79</sup>, Trp<sup>111</sup>, Phe<sup>122</sup>, Pro<sup>218</sup>, Trp<sup>219</sup>, Cys<sup>298</sup> e Leu<sup>300</sup>) que formam a cavidade hidrofóbica do sítio ativo de aldose redutase humana, não se mostram conservados em leveduras, estando ausentes ou muitas vezes substituídos por aminoácidos polares. Isto pode estar relacionado com as diferenças na especificidade entre estas enzimas, uma vez que aldoses redutases humanas usam estritamente NADPH, enquanto xilose redutase de leveduras exibem afinidade também para o substrato NADH (Lee, 1998; Bohren et al., 1991). De fato, Woodyer et al (2005) mostraram que esta diminuição de hidrofobicidade muito provavelmente está relacionada também a menores valores de  $K_m$  da XR para xilose, quando é comparado sequências da região ligante de *Neurospora crassa* em relação a *Candida tenuis*, uma vez que a região ligante de xilose em xilose redutases presentes em *Neurospora crassa* é ligeiramente mais hidrofílica devido a presença de Asn<sup>167</sup>, e a falta de dois resíduos

hidrofóbicos (Phe<sup>132</sup> e Trp<sup>135</sup>).

Através do uso da bioinformática foi possível visualizar que a região ligante da enzima xilose redutase de *S. stiptis* para NADH é formada por 16 resíduos, principalmente hidrofílicos, formando pontes de hidrogênio com o cofator, do qual Glu<sup>223</sup> tem contribuído com mais de uma ligação, o que por sua vez fortalece esta interação. A região ligante da enzima para NADPH também é formado pelos mesmos 16 resíduos, do qual Lys<sup>21</sup> contribui para uma interação mais forte com mais de uma ponte de hidrogênio (Wang et al., 2007). Esses achados podem ser usados para modificações da enzima, melhorando sua dependência tanto para NADH ou NADPH, com o intuito de melhorar a utilização de xilose para a obtenção de álcool combustível.



**Figura 5. Estrutura cristalográfica da enzima xilose redutase da levedura *Candida tenuis*.** (A) Estrutura cristalográfica do dímero. Os monômeros se encontram posicionados lado a lado com os eixos de sua forma de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, aproximadamente 30% em sentido antiparalelo sendo a estrutura de alfa-hélice e folha beta, representadas em azul e marrom, respectivamente. (B) Arranjo da tétrade catalítica (Asp50, Tyr51, Lys80 e His113), com a nicotinamida do cofator (verde) e a molécula de água (esfera amarela) do complexo enzimático com NADP<sup>+</sup> e as pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas (linhas pontilhadas). Modificado de Kratzer et al. (2006).

Estudos de mutagênese sítio dirigida e modificações químicas mostram que o aminoácido Lys<sup>270</sup> da xilose redutase de *S. stiptis* tem um papel crucial para a ligação da coenzima (Kostrzynska et al, 1998). Este resíduo localizado no motivo Ile-Pro-Lys-Ser (IPKS), que é altamente conservado, mostra funcionar como um ancoradouro para a ligação do grupo 2-fosfato do substrato NADPH (Bohren et al, 1991; Wilson et al,



1992; Lee et al, 2003). Outro estudo apontou que a substituição do aminoácido Arg<sup>276</sup> por uma histidina, por mutagênese sítio dirigida, em *S. stipitis* aumentou a preferência da enzima por NADH em relação ao NADPH, passando a atividade da enzima com NADH a ficar 2,5 vezes maior, em relação a sua atividade com NADPH, visto que sem a modificação a atividade da enzima utilizando NADH era inferior quando comparada com NADPH. (Lee et al., 2012).

## 1.5 ESTRUTURA DA ENZIMA XILITOL DESIDROGENASE

Xilitol desidrogenases (E.C. 1.1.1.9) pertencem a subfamília da poliol desidrogenase de uma larga família de enzimas chamada MDR (Desidrogenases/Redutases de cadeia média). Estas utilizam NAD<sup>+</sup> como substrato que se liga a enzima através do motivo de Rossmann (Nordling et al. 2002), um motivo estrutural típico ligante de coenzimas como NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> e FAD<sup>+</sup>, caracterizado pela sequência consenso “Gly-X-Gly-X-X-Gly”, onde “X” representa qualquer aminoácido (Schultz et al., 1982; Hanukoglu, 2015).

Dentro da superfamília MDR, enzimas tetraméricas são primariamente encontradas em leveduras (Nordling et al. 2002; Person et al., 1993). As proteínas MDR tipicamente consistem de dois domínios, onde o C-terminal liga-se a coenzima através do motivo de Rossmann e o domínio N-terminal liga-se ao substrato. O substrato basicamente liga-se ao átomo de zinco através de uma ponte de hidrogênio e o mecanismo catalítico para a maioria das ADHs (álcool desidrogenases) é ordenado com a ligação da coenzima NAD<sup>+</sup> antes do substrato, de forma que a deprotonação do substrato álcool e sua ligação ao átomo de zinco, facilite a transferência híbrida para a nicotinamida do NAD<sup>+</sup>. (Eklund and Ramaswamy, 2008).

Enzimas com atividade de XDH, também são classificadas como membros da família SDR (oxidorreduções de cadeia pequena), caracterizados por conter a tétrade catalítica Ser-Tyr-Lys-Asn. A maioria destas oxidorreduções utilizam NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> e todas as estruturas determinadas mostram conter um motivo de Rossmann. A enzima XDH da bactéria *Gluconobacter oxydans* foi classificada como membro da família SDR (Ghosh et al., 2001; Oppermann et al., 2003).

Alinhamento de sequências de aminoácidos da enzima xilitol desidrogenase de leveduras como *S. stipitis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida tropicalis* e *Kleuveromyces marxianus*, mostram uma típica assinatura de álcool desidrogenases pertencentes à família MDR e ligantes a NAD<sup>+</sup> e a um átomo de Zn (Watanabe et al. 2005; Biswas et

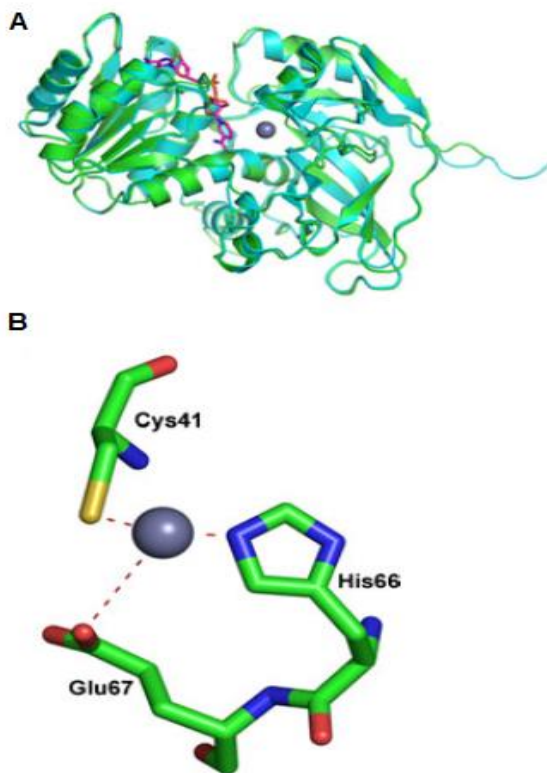
al., 2013; Boontham et al., 2012; Lulu et al., 2013; Person et al. 1994).

Utilizando a sequência de aminoácidos de XDH de *Debaryomyces hansenii* e o programa PROCHECK, o modelo de estrutura da proteína mostrou dois domínios, um domínio ligante a coenzima e um domínio com o sítio ativo, com uma fenda separando-os (Figura 6A). Neste modelo, o domínio ligante ao substrato abrange os resíduos de aminoácidos entre 162 e 300 e três resíduos – Cys<sup>41</sup>, His<sup>66</sup> e Glu<sup>67</sup> – foram supostamente estabelecidos como os aminoácidos ligantes ao zinco (Biswas et al., 2013). Ao verificar o efeito de mutações nesses três putativos resíduos ligantes de zinco, sendo estes trocados pelo resíduo alanina, foi observado a total perda de atividade da enzima, indicando claramente que estes são essenciais para a atividade de xilitol desidrogenase em *D. hansenii* (Biswas et al., 2013). De fato, Watanabe et al (2005) já havia demonstrado anteriormente que os resíduos – Cys<sup>41</sup>, His<sup>66</sup> e Glu<sup>67</sup> – são os ligantes do átomo de zinco em *S. stipitis*.

Muitos membros da família MDR contém um adicional átomo de zinco que confere um papel estrutural e fornece estabilidade da enzima. Watanabe et al. (2005) e Biswas et al. (2013) demonstraram que a introdução de um sítio ligante de zinco à enzima XDH aumentou a estabilidade térmica da enzima. Em ambas as espécies analisadas, *D. hansenii* e *S. stipitis*, estudos de mutagênese sítio dirigida, substituindo os resíduos Ser<sup>96</sup>, Ser<sup>99</sup> e Tyr<sup>102</sup> por cisteínas, aumentou a estabilidade térmica da enzima (Biswas et al., 2013; Watanabe et al., 2005) e demonstra que enquanto o primeiro átomo de zinco muito provavelmente está relacionado com a atividade da enzima e estrutura, o segundo átomo de zinco produz significativa termoestabilização, permitindo que a enzima trabalhe em temperaturas maiores (Watanabe et al., 2005). Os resíduos Cys ligantes do segundo átomo de zinco, presente em muitos membros da família MDR, não são conservados em xilitol desidrogenases de leveduras, o que sugere que este átomo de zinco estrutural pode ter sido perdido nestas enzimas ao longo da evolução (Person et al., 1993).

Com a substituição dos resíduos (D207A/I208R/F209S/N211R) Watanabe et al., 2005 demonstrou em *S. stipitis*, por mutagênese sítio dirigida, a reversão de afinidade do substrato NAD<sup>+</sup> pelo substrato NADP<sup>+</sup> da enzima xilitol desidrogenase. Estudo semelhante foi realizado em *D. hansenii* por Biswas et al., 2013, com a substituição dos resíduos (D207A, V208R, F209S, S211R) e (D207A, V208R, F209S, E210A, S211R), o que permitiu a reversão de afinidade do substrato NAD<sup>+</sup> para NADP<sup>+</sup>, onde o primeiro mutante mostrou pouca atividade com NAD<sup>+</sup> (~ 3%) quando comparado com a atividade com NADP<sup>+</sup>, e o

segundo mutante mostrou nenhuma atividade com  $\text{NAD}^+$ , salientando a importância destes resíduos para a ligação da enzima as coenzimas (Figura 6B).



**Figura 6. Modelagem por homologia baseada na estrutura 3D da enzima xilitol desidrogenase da levedura *Debaryomyces hansenii*.** (A) A representação da enzima XDH ligada a coenzima  $\text{NAD}^+$  e ao átomo de zinco. O domínio ligante da coenzima e o domínio ligante do átomo de zinco são separados por uma fenda. (B) Resíduos (Cys41, His66 e Glu67) interagindo com o átomo de Zinco. Modificado de Biswas et al., (2013)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver leveduras *S. cerevisiae* recombinantes contendo genes para metabolização da xilose, isolados de novas espécies de leveduras *Spathaspora* brasileiras, visando a produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Identificar nos genomas já sequenciados e anotados das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum* novos genes que codifiquem às enzimas do metabolismo da xilose:** foi realizada buscas de sequências que correspondam as enzimas xilose reductase e xilitol desidrogenase já caraterizadas de outras espécies no banco de dados do NCBI.
- **Clonar e expressar os genes de *S. passalidarum* e *S. arborariae* que codifiquem para as enzimas do metabolismo da xilose:** genes, cujas sequências apresentaram alta homologia às sequências dos genes que codificam as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, foram inseridos em plasmídeos contendo promotor forte e constitutivo, e expressos em *S. cerevisiae*.
- **Analisar os parâmetros cinéticos das enzimas do metabolismo da xilose clonadas:** foram determinados os parâmetros cinéticos das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, utilizando diferentes concentrações dos substratos NADPH, NADH e xilose, e diferentes concentrações dos substratos  $\text{NAD}^+$  e xilitol, respectivamente.
- **Analisar a utilização de xilose pelas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes expressando os genes do metabolismo da xilose:** através de crescimentos e fermentações em batelada, foi avaliado a produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol, xilitol, glicerol e ácido acético pelas leveduras recombinantes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As leveduras usadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. Para a clonagem, a linhagem de bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , foi crescida em meio Luria Bertani (10 g/L triptone, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L cloreto de sódio) e suplementada com 100mg/L de ampicilina.

As linhagens de leveduras isoladas de madeira em decomposição de regiões de ecossistemas Brasileiros, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG. *Sacharomyces cerevisiae* CENPK2-1C, contendo o gene *XKS1* sobre-expresso, foi usada como levedura hospedeira para a expressão heteróloga dos genes clonados, oriundos das leveduras *Spatahspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*.

As leveduras foram crescidas em meio YP rico (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona) com 20 g/L de glicose ou xilose, ou meio sintético (0,67% base de nitrogênio com aminoácidos ou 0,67% base de nitrogênio sem aminoácidos, suplementado com adequados requirements auxotróficos – Sigma Aldrich), sem uracila ou sem uracila e histidina e contendo 20 g/L de glicose ou 20g/L de xilose. Todos os meios de cultura utilizados para leveduras, tiveram seu pH ajustado para 5 com HCl ou NaOH.

Para os testes de crescimento e fermentação em batelada, as leveduras transformantes foram crescidas em meio sintético, suplementado com meio drop out sem os aminoácidos leucina, triptofano e histidina e a base uracila (Sigma Aldrich), acrescidos de 400mg/L de leucina e 320mg/L de triptofano.

**Tabela 1. Linhagens de leveduras utilizadas.**

Linhagem	Genótipo ou descrição	Fonte ou referência
<i>S. arborariae</i> HM-19.1a	Isolado de madeira em decomposição; Minas Gerais, Brasil	Cadete et al. 2009
<i>S. passalidarum</i> HMD-1.3	Isolado de madeira em decomposição; Roraima, Brasil	Cadete et al. 2012
<i>S. passalidarum</i> H.M.D.-16.2	Isolado de madeira em decomposição; Roraima, Brasil	Cadete et al. 2012

<i>S. suhii</i> XMD-16.2	Isolado de madeira em decomposição; Roraima, Brasil	Cadete et al., 2013
<i>S. brasilienses</i> HMD- 19.3	Isolado de madeira em decomposição; Roraima, Brasil	Cadete et al., 2013
<i>S. roraimanenses</i> XMD-23.2	Isolado de madeira em decomposição; Roraima, Brasil	Cadete et al., 2013
<i>S. materieae</i> Car 15.1b	Isolado de madeira em decomposição; Minas Gerais, Brasil	Barbora et al., 2009
<b><i>S. cerevisiae:</i></b>		
CENPK2-1C	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8° SUC2</i>	Entian & Kötter 1998
ASY-1	<i>CENPK2-1C loxP-KanMX-loxP-P<sub>ADHI</sub>::XKS1</i>	LBMBL-UFSC <sup>a</sup>
AMY-1	CENPK2-1C + pPGK	Este estudo
AMY-2	CENPK2-1C + pPGK-XR2	Este estudo
AMY-3	CENPK2-1C + pPGK-XR3	Este estudo
AMY-4	CENPK2-1C + pPGK-XR4	Este estudo
AMY-2.1	CENPK2-1C + pPGK-AR2	Este estudo
AMY-4.1	CENPK2-1C + pPGK-AR4	Este estudo
AMY-5	CENPK2-1C + pPGK-XDH1	Este estudo
AMY-6	CENPK2-1C + pTEF423-XDH1	Este estudo
AMY-2-6	ASY-1 + pPGK-XR2+ pTEF423-XDH1	Este estudo
AMY-3-6	ASY-1 + pPGK-XR3+ pTEF423-XDH1	Este estudo
AMY-4-6	ASY-1 + pPGK-XR4+ pTEF423-XDH1	Este estudo

<sup>a</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – UFSC

## 3.2 CULTIVOS CELULARES

### 3.2.1. Condições de cultivo

Os pré-cultivos das leveduras foram realizados em tubos contendo 3 ml de meio YP ou sintético suplementado, conforme descrito anteriormente, acrescidos de 2% da fonte de carbono desejada (glicose ou xilose), por 48 horas, com agitação constante de 160 rpm a 28°C. Alternativamente, os pré-cultivos foram realizados em Erlenmeyers contendo 10 ml de meio sintético com 2% de xilose ou glicose, ocupando 1/5 do volume do frasco.

Uma alíquota destes pré-cultivos foi inoculada em seus respectivos meios em frascos Erlenmeyers ocupando 1/5 do volume do frasco, de forma a atingir uma D.O. (densidade óptica) de 0,1 e parâmetros de crescimento foram determinados através de coletas de amostras em tempos determinados e medidas em espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies) a 570 nm para verificar o aumento de massa celular. A seguir, as células foram removidas por centrifugação (6.000 rpm por 3 min) e o sobrenadante utilizado para determinação de açúcares e produtos de fermentação.

Para a determinação da concentração de células em g/L, foi utilizada a densidade óptica das células, multiplicada pelo fator de conversão 0,27 e a diluição da amostra (equação 1), conforme descrito por Dario (2012). Para as linhagens de *Spathaspora*, alternativamente, foi utilizado o fator 0,24 (Mouro, 2012).

$$X_{(g/L)} = ABS_{amostra} \cdot d \cdot f \quad (1)$$

X= concentração da biomassa celular na amostra

ABS<sub>amostra</sub>= absorvância da amostra em 570 nm.

d= diluição da amostra

f= fator de conversão da absorvância para a biomassa de leveduras.

### 3.2.2. Fermentação em batelada

Para a realização deste ensaio, as linhagens foram pré crescidas em 10 ml de meio sintético e cultivadas em 100 ml de meio sintético contendo 2% de glicose, conforme descritas anteriormente, até atingir uma concentração de aproximadamente 1g de células por L. Em

seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada a 4°C e ajustadas a 10 g/L de células em meio sintético contendo a fonte de carbono de interesse a uma concentração final de 20 g/L, com um volume final de 20 ml em erlenmeyers de 50 ml. Em tempos determinados, foram removidos alíquotas, centrifugadas e o seu sobrenadante utilizado para determinar o consumo de açúcar e produtos da fermentação, além de ser determinada a concentração celular das amostras.

### 3.2.3. Determinações bioquímicas

As determinações de consumo de glicose, xilose e produção de etanol, xilitol, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Jasco X-LC), com detector de índice de refração index (RI 2031 plus, Jasco) e coluna para ácidos orgânicos (HyperREZ XP Organic Acid Column, Thermo Scientific). A fase móvel utilizada foi 5mM de ácido sulfúrico, a 20 °C, com fluxo de 0,3 ml/min e 10 µL de injeção de amostra. Alternativamente, para a determinação de ácido acético e glicerol, foi utilizada a coluna para ácidos orgânicos (Aminex® HPX – 87H, Bio–Rad Organic Acid Column), 5 mM de ácido sulfúrico, 50 °C, com fluxo de 0,2ml/min.

## 3.3 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 3.3.1. Clonagem dos genes de interesse

Através de ferramentas de bioinformática BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a sequência do genoma de *S. arborariae* (Lobo et al., 2014) foi utilizado para a busca de novos genes com homologia a genes anotados de XRs e XDHs de leveduras. Com base nas sequências obtidas, primers (Tabela 2) foram construídos para a amplificação destes genes, introduzindo os sítios de restrição (*EcoRI* e *BamHI*) para a clonagem no plasmídeo pPGK (Watanabe et al. 2007), um plasmídeo multicópia contendo um forte promotor constitutivo e terminador *PGK* (fosfoglicerato quinase), como também o gene para resistência ao antibiótico ampicilina e o gene *URA3*, para complementar a auxotrofia presente na levedura a ser transformada. Paralelamente, foi utilizado o plasmídeo pTEF 423 (Mumberg et al., 1995), contendo um forte promotor constitutivo *TEF* (fator embrionário tireotrófico) e terminador *CYC1* (citocromo C1), o gene contendo resistência para



ampicilina e o gene *HIS3* usado para complementar a auxotrofia presente na levedura a ser transformada. O DNA genômico das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum* foram isolados e purificados com o YeaStar Genomic DNA Kit™ (Zymo Research).

**Tabela 2. Primers usados neste estudo.**

Primer	Sequencia (5' – 3') <sup>a</sup>
AR- <i>Sa</i> -F <sup>b</sup>	ATGAATTCATGACTAAAACCTCCTGTTCAAT
AR- <i>Sa</i> -R <sup>b</sup>	TAGGATCCTAAGCAAAGACATTCCA
XR- <i>Sa</i> -F <sup>b</sup>	ATGAATTCATGGCTACTATTAAATTATCCTCAGGT
XR- <i>Sa</i> -R <sup>b</sup>	TTGGATCCTTAAACAAAGATTGGAATGTTGTCC
XDH- <i>Sp</i> -F <sup>b</sup>	ATGAATTCATGGTTGCTAATCCCTCTTTAGTG
XDH- <i>Sp</i> -R <sup>b</sup>	CTGGATCCCCTACTCTGGTCCATCAATTAAACACTT
XDH <sub>tef</sub> - <i>Sp</i> -F <sup>c</sup>	ATAGATCTATGGTTGCTAATCCCTCTTTAGTG
XDH <sub>tef</sub> - <i>Sp</i> -R <sup>c</sup>	CTAGATCTCTACTCTGGTCCATCAATTAAACACTT
XKS1m-Kan-F <sup>d</sup>	ATTCGGCCAATGCAATCTCAGGCGGACGAATAAGGG GGCCCCAGCTGA AGCTTCGTACGC
XKS1i-ADH1-R <sup>e</sup>	AAACCTCTCTTGTCTGTCTCTGAATTACTGAACACAA CATTGTATATGAGA TAGTTG
Ant- <i>XKS1</i> <sup>f</sup>	CAAGCGACGCAGGGAATAGCC
Pos- <i>XKS1</i> <sup>g</sup>	CTTCGTTCACTCTCTGTTGTGAGC
Prom_PGK_5_4_F <sup>h</sup>	ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATC
Ter_PGK_65_REV <sup>h</sup>	TTAGCGTAAAGGATGGGGAAAGAG

<sup>a</sup> A sequência dos sítios de restrição estão sublinhadas. <sup>b</sup> primers utilizados para a clonagem com pPGK. <sup>c</sup> primers utilizados para a clonagem com o pTEF423. <sup>d</sup> a sequência em negrito corresponde ao início do gene *KanMX*. <sup>e</sup> sequência em negrito corresponde ao final do gene *ADH1*. <sup>f</sup> primers anterior a sequência *XKS1* para verificação da recombinação homóloga <sup>g</sup> primer dentro do gene *XKS1* para verificação da recombinação homóloga <sup>h</sup> sequenciamento dos genes clonados no plasmídeo PGK.

As amplificações foram realizadas utilizando as seguintes condições de PCR: 98°C por 30 s em 1 ciclo, seguido de 98 °C por 10 s, 50 °C por 20 s, 72 °C por 30 s em 29 ciclos e 72 °C por 5 min em 1 ciclo, com 1 unidade da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase utilizando os primers AR-*Sa*. A temperatura de anelamento foi de 51 °C por 20 s em vez de 50 °C quando foi utilizado os primers XR-*Sa*. Para a amplificação com os primers XDH-*Sp*, a temperatura de anelamento foi de 53 °C por 30 s. Com os fragmentos de DNA amplificados, estes foram separados através de eletroforese, com gel de 1% de agarose, 90 volt/cm por 40 min. Em seguida, os fragmentos foram purificados, utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare). Todos os fragmentos foram digeridos com 30 unidades das enzimas *Eco*RI and *Bam*HI, e ligados no pPGK ou pTEF-423 (Tabela 3), que previamente foram linearizados com as mesmas enzimas de restrição. Os fragmentos e plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição foram ligados com a enzima T4 ligase (Thermo Scientific). Os plasmídeos com seus respectivos fragmentos foram inseridos em *E. coli* DH5 $\alpha$ , através do método de cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1992). Para o procedimento de clonagem, 1-5  $\mu$ g de plasmídeo foi adicionado a 80  $\mu$ L de células competentes (previamente tratadas com 60 mM CaCl<sub>2</sub> contendo 15% glicerol em tampão 10 mM Pipes, pH 7,0) e mantidas no gelo por 10 min. Em seguida, as células foram incubadas a 42°C por 2 min, resfriadas em gelo por 1 min, adicionado 500  $\mu$ L de meio LB e incubados a 37°C por 1 hora a 160 rpm. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de meio LB e plaqueadas em placas de meio LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Com os plasmídeos clonados, estes foram purificados através extração de DNA plasmidial em bactérias por lise alcalina (Ausubel et al., 1992).

**Tabela 3. Plasmídeos utilizados nesse estudo.**

Plasmídeos: <sup>a</sup>		
pPGK	URA3 PGK1p-PGK1t	Watanabe et al. 2007
pPGK-XR2	PGK1p-XR( <i>Sp</i> 1.3)-PGK1t	Este estudo
pPGK-XR3	PGK1p-XR( <i>Sp</i> 16.2)-PGK1t	Este estudo
pPGK-XR4	PGK1p-XR( <i>Sa</i> 19.1a)-PGK1t	Este estudo
pPGK-AR2	PGK1p-AR( <i>Sp</i> 1.3)-PGK1t	Este estudo
pPGK-AR4	PGK1p-AR( <i>Sa</i> 19.1a)-PGK1t	Este estudo
pPGK-XDH1	PGK1p-XDH( <i>Sp</i> 16.2)-PGK1t	Este estudo
TEF-423	HIS3 TEFp-CYC1t	ATCC®
TEF-423-XDH1	TEFp-XDH( <i>Sp</i> 16.2)-CYC1t	Este estudo

<sup>a</sup>Em parênteses estão indicados a origem dos genes: *S. passalidarum* (*Sp*) or *S. arborariae* (*Sa*)

### 3.3.2. Transformação de leveduras

Todos os plasmídeos multicópias pPGK e pTEF-423, descritos na Tabela 3, foram transformados em leveduras *S. cerevisiae* CENPK2-1C ou ASY-1, pelo método acetato de lítio (Gietz et al. 1992). Após o crescimento das leveduras (D. O. – 1) em meio YPD 2%, estas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada estéril gelada e ressuspensas em solução de TE/AcLi (contendo 110 µL de solução de 1 mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 110 µL acetato de lítio 1 M e 780 µL H<sub>2</sub>O miliQ estéril). Para cada transformação, foi adicionado 200 µg de DNA de esperma de salmão, 1-5 ng de plasmídeo e 340 µL da solução PEG3350/AcLi (contendo 272 µL de solução PEG 50% e 68 µL de solução TE/AcLi) em 50 uL de suspensão celular previamente preparada, e incubadas a 30 °C por 30 min. Em seguida as células submetidas a choque térmico a 42 °C por 15 min, resfriadas em gelo, centrifugadas, retirado o sobrenadante, adicionado 800 µL de meio YPD2% e incubados a 30 °C, por 90 min a 160 rpm. As leveduras transformadas foram centrifugadas e ressuspensas em 50 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril e inoculadas em placas contendo meio sintético (SC) com 2% de glicose sem uracila ou sem uracila e histidina. As linhagens de leveduras recombinantes estão listadas na Tabela 1.

### 3.3.3. Sobre-expressão do gene *XKS1* por recombinação homóloga

A modificação genômica desenvolvida na levedura de laboratório *S. cerevisiae* CENPK2-1C, foi baseada em técnicas de amplificação do DNA por PCR e integração genômica por recombinação homóloga (Petracek et al., 2002; Demarini et al., 2001; Gietz et al 1992).

Inicialmente foi realizada a amplificação da região contendo a sequência do gene *KanMX* e a região promotora do gene *ADHI*, utilizando os primers XKS1m-Kan-F e XKS1i-ADHI-R (Tabela 2), que confere resistência ao antibiótico geneticina, além do promotor *ADHI* para a sobre-expressão do gene *XKS1*, utilizando a levedura BSY21-34B (Müller, 2013). Por técnica de recombinação homóloga (Petracek et al., 2002; Demarini et al., 2001; Gietz et al., 1992), esse fragmento amplificado foi inserido a montante do gene *XKS1*, conferindo a linhagem ASY-1, resistência ao antibiótico geneticina, além da sobre-expressão do gene *XKS1*, pelo promotor forte e constitutivo *ADHI*. A confirmação da inserção foi realizada por PCR, utilizando os primers Ant\_*XKS1* e Pos\_*XKS1*, obtendo um fragmento de 3900 pb.

### 3.3.4. Eletroforese em gel de agarose.

Todos os plasmídeos com o gene de interesse inserido, após digestão com suas respectivas enzimas de restrição e os fragmentos amplificados por PCR, foram confirmados e analisados através de eletroforese em gel de agarose.

As amostras contendo o tampão de corrida DNA loading (Fermentas) e marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb (Fermentas) foram aplicadas em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e tampão TBE 0,5X (1 mM EDTA e tampão 45 mM TRIS-borato pH 8). As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão de corrida TBE 0,5X, 90 volt/cm, por 40 min e analisados e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad).

### 3.3.5 Sequenciamento dos genes codificantes para xilose redutase e xilitol desidrogenases clonados.

Os genes procedentes das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum* clonados no vetor pPGK, tiveram seu DNA sequenciado.

As amostras foram submetidas a análise, contendo em cada eppendorfe, quantidades de plasmídeos entre 300 ng-600 ng e 10 µl de cada primer, Prom\_PGK\_54\_F e Ter\_PGK\_65\_REV (tabela 2), concentrado em 10 picomol/µl. Os primers utilizados para o sequenciamento anelam-se 54 pares de bases anteriores a região 5' do final do promotor PGK (Prom\_PGK\_54\_F) e 65 pares de bases posteriores a região 3' do início do terminador PGK (Ter\_PGK\_65\_REV).

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, utilizando ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA) na empresa STABVIDA, Lisboa, Portugal e as sequências foram analisadas pelo programa Bio Edit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

### **3.3.6 Alinhamento de sequências e análise filogenética.**

As sequências dos genes clonados e sequenciados neste estudo foram alinhadas com outras sequências com homologia a genes anotados das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase no banco de dados NCBI. Para este estudo, foram utilizadas suas sequências de aminoácidos. As ferramentas utilizadas para o alinhamento múltiplo e construção da árvore filogenética foram os COBALT (Papadopoulos & Agarwala, 2007) e o Blast Tree View, respectivamente, através do programa de bioinformática BLAST-NCBI. Alternativamente, foi utilizado o programa de bioinformática ClustalW Omega de EMBL-EBI – European Bioinformatics Institute (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011; McWilliam et al., 2013).

## **3.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Após o crescimento das leveduras em meio mínimo com 2% de glicose ou 2% de xilose por 48 h a 28°C, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada a 4 °C, concentradas em 20 g/L e 100 µL ressuspensas em tampão contendo 20% de glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM MOPS-NaOH pH 6.8 e lisadas com bolinhas de vidro 425-600 µm, lavadas em ácido (Sigma Aldrich). Alternativamente, as células foram lisadas com o tampão YPER (Pierce Rockford, IL, USA), em agitador orbital, a 160 rpm por 1 hora. A seguir as células e debris celulares foram removidos por centrifugação (12.000 g, 5 min, a 4 °C), e o sobrenadante utilizado nas determinações enzimáticas.

A concentração de proteínas nos extratos celulares foi determinada como descrito por Bradford (1976) ou através do Kit BCA (Thermo Scientific). Para a análise com Bradford, 25  $\mu\text{L}$  de amostra foi incubada com 225  $\mu\text{L}$  de reagente Bradford por 15 minutos a 37° C e lido em placas de Elisa a 562 nm no equipamento TECAN Infinite M2000. Para a análise com o Kit BCA, 200  $\mu\text{L}$  da amostra foi incubada com 200  $\mu\text{L}$  do reagente, por 1 hora a 60 °C em banho-maria. A seguir a amostra foi lida a 562 nm em leitor de placas Mustang GO, Thermo scientific. Para os dois métodos, a concentração de proteína foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com a equação da reta obtida através de uma curva padrão construída com soluções padrão de albumina entre 0 e 200  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.4.1 Determinação da atividade da enzima xilose redutase**

A atividade da enzima xilose redutase foi determinada através da quantificação da oxidação do NADPH ou NADH, medido a 340 nm em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-VIS, utilizando-se um coeficiente de extinção molar ( $\Delta\epsilon$ ) para os cofatores a 340 nm de 6220  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , conforme descrito de Walfridsson et al. (1997), Smiley & Bolen (1982). A atividade enzimática foi determinada a 30 °C em tampão 45,5 mM fosfato de potássio pH 6,0, contendo 200 mM de xilose, e as reações iniciadas com a adição de 0,15 mM de NADH ou NADPH. A atividade enzimática foi também avaliada em diferentes concentrações (1 a 400  $\mu\text{M}$ ) de NADPH ou NADH ou em diferentes concentrações de xilose (0,5 a 600 mM) em tampão 45,5 mM fosfato de potássio pH 6, para determinar o  $K_m$  da enzima para estes substratos. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de produto ( $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ ) por minuto.

### **3.4.2 Determinação da atividade da enzima xilitol desidrogenase**

A atividade da enzima xilitol desidrogenase foi determinada através da quantificação da redução do  $\text{NADP}^+$  ou  $\text{NAD}^+$ , conforme descrito de Walfridsson et al. (1997), Smiley & Bolen (1982). A atividade enzimática foi determinada a 35 °C em tampão 50 mM Tris-HCl pH 9,0, contendo 50 mM  $\text{MgCl}_2$  e 300 mM de xilitol, e as reações iniciadas com a adição de 1 mM de  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ . A atividade enzimática foi também avaliada em diferentes concentrações (1 a 4000  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{NAD}^+$  ou em diferentes concentrações de xilitol (0,1 a 500 mM)

em tampão 50 mM tris-HCl pH 9, para determinar o  $K_m$  da enzima para estes substratos. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de produto (NADPH/NADH) por minuto.

## 4 RESULTADOS

A avaliação da capacidade fermentativa de leveduras isoladas da Biodiversidade brasileira, mostrou que leveduras do gênero *Spathaspora*, em especial *S. passalidarum*, apresentam um melhor rendimento de fermentação ( $Y_{e/s}$ , g etanol/ g açúcar) utilizando xilose, comparado com glicose. E embora a levedura *S. arborariae* tenha apresentado rendimento de fermentação igual para ambos os açúcares citados anteriormente, esta levedura produziu altas quantidades de etanol (Mouro, 2012).

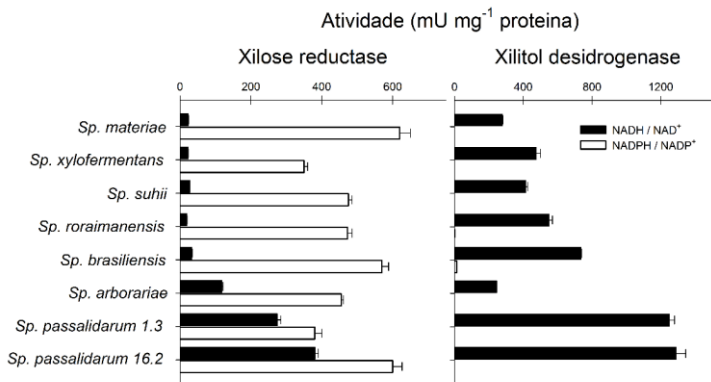
No intuito de verificar as possíveis causas desses melhores rendimentos e buscar enzimas que apresentem características cinéticas apropriadas, neste estudo a atividades das enzimas XR e XDH foram determinadas em diferentes leveduras *Spathaspora*. A seguir a suas características cinéticas, utilizando diferentes concentrações de xilose, xilitol e coenzimas, foram determinadas nas linhagens selvagens *S. passalidarum* e *S. arborariae*. Finalmente, foram realizadas também a clonagem e expressão dos genes que codificam para as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *S. passalidarum* e *S. arborariae*, em *S. cerevisiae*.

### 4.1 ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE EM LEVEDURAS *SPATHASPORA*

Na Figura 7 estão mostradas as atividades das enzimas XR e XDH em linhagens de leveduras do clado *Spathaspora*. As espécies *S. materiae*, *S. brasilienses*, *S. suhii*, *S. roraimenenses*, e *S. xylofermentans* apresentaram significativa atividade XR dependente de NADPH, e praticamente nenhuma atividade com NADH. As espécies *S. arborariae* e *S. passalidarum* se destacam das outras leveduras *Spathaspora*, pois exibem atividade XR com ambos as coenzimas, inclusive com uma significativa atividade XR com NADH. Por outro lado, todas estas leveduras demonstraram possuir atividade XDHs estritamente dependentes de  $NAD^+$ , sendo que novamente as leveduras *S. passalidarum* apresentam as mais altas atividades XDH, quando comparadas com a atividade presentes nas outras espécies. Dessa forma, os resultados sugerem que leveduras *Spathaspora*, especialmente a *S. passalidarum* e *S. arborariae*, podem ser candidatos promissores para a



fermentação industrial de hidrolisados lignocelulósicos.



**Figura 7. Atividade da enzima xilose redutase e xilitol desidrogenase das leveduras do clado *Spathaspora*, isoladas da biodiversidade Brasileira.** As leveduras indicadas, pré-crescidas em xilose, tiveram suas atividades XR e XDH determinadas como descrito em Materiais e Métodos.

Com base nestes resultados, realizamos a caracterização cinética das enzimas XR e XDH presentes nas linhagens de *S. passalidarum* e *S. arborariae*. A Tabela 4 mostra as características cinéticas das enzimas XR e XDH das linhagens selvagens *S. passalidarum* e *S. arborariae*, utilizando diferentes concentrações de NADPH, NADH e xilose para a XR, e diferentes concentrações de NAD<sup>+</sup> para a XDH. A análise dos parâmetros cinéticos da XR encontrada na linhagem de *S. passalidarum* HMD 16.2 revelou que a enzima apresenta alta afinidade por ambos os substratos (NADPH e NADH), como também um  $K_m$  menor para NADH em relação a NADPH. Embora a afinidade por NADH tenha se mostrado maior em relação ao NADPH, a velocidade máxima é maior quando a enzima utiliza NADPH. Curiosamente, a análise dos parâmetros cinéticos da XR em *S. passalidarum* HMD 1.3 mostra que a enzima apresenta maior afinidade pelo substrato NADPH, como também maior atividade da enzima utilizando este substrato quando comparado com a sua atividade utilizando NADH. A atividade da enzima XR na levedura *S. arborariae* exibiu um  $K_m$  maior, indicando menor afinidade, porém com uma boa atividade, considerando sua velocidade máxima, quando esta enzima foi

avaliada utilizando NADH. Em relação ao cofator NADPH, a atividade de *S. arborariae* exibiu uma enzima com alta afinidade e alta atividade.

A análise dos parâmetros cinéticos utilizando diferentes concentrações de xilose mostrou que a XR das linhagens *S. arborariae* e *S. passalidarum* HMD 1.3 apresentaram maior afinidade quando estas utilizaram NADPH como substrato, em relação ao NADH, igualmente suas velocidades máximas foram superiores utilizando NADPH. Considerando a afinidade pela xilose da XR da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, utilizando NADH, observamos um menor  $K_m$ , quando comparado com as duas outras linhagens anteriormente descritas.

Em relação a xilitol desidrogenase da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, os parâmetros cinéticos mostraram uma enzima com baixa afinidade, e boa atividade, considerando sua atividade máxima, utilizando  $\text{NAD}^+$  como substrato (Tabela 4).

**Tabela 4. Parâmetros cinéticos das enzimas XR e XDH presentes nas linhagens das leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae*.**

<b>Xilose Redutase</b>								
<b>Levedura</b>	<b>NADPH</b>		<b>NADH</b>		<b>Xilose (NADPH)</b>		<b>Xilose (NADH)</b>	
	$K_m^a$	$V_{\max}^b$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$
<i>S. passalidarum</i> HMD 1.3	8,9±1,9	0,4±0,01	65,8±16,1	0,2±0,01	38,1±4,8	0,4±0,01	155,7±14	0,3±0,01
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	17,5±0,0	0,5±0,0	10,7±3,1	0,4±0,03	---- <sup>c</sup>	---- <sup>c</sup>	37,7±2,6	0,3±0,0
<i>S. arborariae</i> HM 19.1a	10,6±3,5	0,7±0,05	104,6±9,8	0,3±0,0	25,1±6,2	0,6±0,04	106,9±50	0,3±0,04
<b>Xilitol Desidrogenase</b>								
	<b><math>\text{NAD}^+</math></b>		<b>Xilitol</b>					
	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$				
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	128,8±0,0	1,24±0,0	----- <sup>c</sup>	----- <sup>c</sup>				

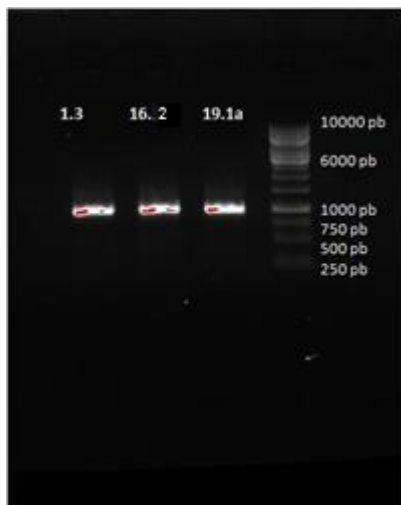
<sup>a</sup>Afinidade da enzima, em  $\mu\text{M}$  para NADH/NADPH, e mM para xilose.

<sup>b</sup>Velocidade máxima da enzima, em U/mg de proteína. <sup>c</sup>Não determinado

## 4.2 CLONAGEM DE GENES EM LINHAGEM DE LABORATÓRIO *S. CEREVISIAE*.

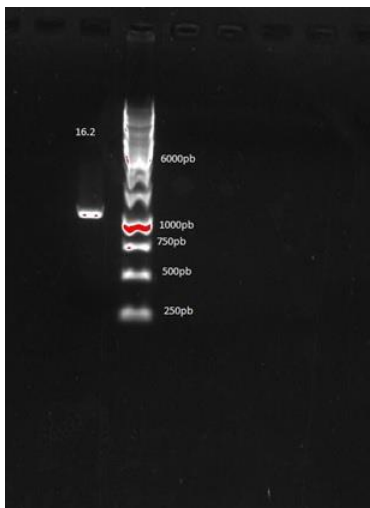
Conforme mostra a Tabela 4 e a Figura 7, as linhagens das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum*, que foram crescidas em 2% de xilose, mostraram uma atividade de XR utilizando ambos os substratos NADPH e NADH. Na levedura *S. passalidarum* a atividade com NADH foi de 60 a 75 % da atividade com NADPH, enquanto que na *S. arborariae* a atividade de XR dependente de NADH correspondeu a ~35% da atividade com NADPH. Com o intuito de clonar XRs destas leveduras, inicialmente, foi utilizado a sequência do genoma anotado automaticamente da levedura *S. arborariae* HM 19.1a (Lobo et al., 2014), para identificar possíveis genes que codifiquem para a XR. Esta estratégia permitiu a identificação de uma ORF com 899 nucleotídeos com significativa homologia com XR de muitos microorganismos, incluindo a ORF anotada como uma aldo/ceto redutase em *S. stiptis* (71% de identidade) e *C. tenuis* (66% de identidade). Este gene de aproximadamente ~0,9 kb foi amplificado utilizando os primers AR-Sa-F and AR-Sa-R (Tabela 2) e o DNA genômico de *S. arborariae*, como também da linhagem *S. passalidarum* HMD 1.3 e clonado. No entanto, quando estes genes foram expressos em *S. cerevisiae* (linhagens AMY-4.1 e AMY-2.1, respectivamente, ver em Tabela 1), nenhuma atividade de XR pode ser detectada tanto com o substrato NADH como com NADPH (dados não mostrados), uma vez que a atividade específica detectada nestas leveduras transformantes foi idêntica a atividade encontrada em leveduras transformadas com o vetor vazio (0,03 U/mg; ver em linhagem AMY-1, Tabela 1).

Em uma outra estratégia, a partir do genoma da *S. passalidarum* (Wohlbach et al., 2011) foi realizada uma busca, com o uso de BLASTp, para os genes de XR, e uma sequência de xilose redutase com 318 aminoácidos (chamada de *XYLI.1*), foi utilizada para a busca de sequências similares no genoma de *S. arborariae*, permitindo a identificação de uma ORF não anotada que apresentou 94% de identidade (no que se refere a sua sequência de aminoácidos), com o gene *XYLI.1* de *S. passalidarum*. Com o uso dos primers XR-Sa-F and XR-Sa-R (Tabela 2), construídos a partir da sequência encontrada no genoma da *S. arborariae*, um fragmento de DNA de ~1 kb (Figura 8) foi amplificado a partir do DNA genômico das linhagens *S. arborariae* HM19.1a, *S. passalidarum* HMD 1.3 e *S. passalidarum* HMD 16.2, clonado no vetor multicópia pPGK e inserido na *S. cerevisiae* CENPK 2-1C.



**Figura 8. Amplificação por PCR dos genes *XYL1* a partir de linhagens *S. arborariae* and *S. passalidarum*.** O produto de PCR do gene *XYL1* a partir de *S. arborariae* HM-19.1a (esquerda), *S. passalidarum* HMD-1.3 (direita), e *S. passalidarum* HMD-16.2 (centro) foi analisada em gel de agarose 1% e corada com brometo de etídeo.

Para a clonagem e expressão da enzima xilitol desidrogenase, a partir do genoma *S. passalidarum* (Wohlbach et al., 2011) foi realizada uma busca, com o uso de BLASTp, para os genes anotados como XDH e uma sequência de 362 aminoácidos (*XYL2.2*) foi encontrada e utilizada para a busca de sequências similares dentro do genoma de *S. arborariae* disponível no NCBI, onde nenhuma sequência com significativa similaridade foi encontrada. Nesse caso, a partir da sequência de XDH encontrada no genoma da *S. passalidarum*, foi realizada a construção dos primers XDH-*Sp*-F e XDH-*Sp*-R (Tabela 2) e um fragmento de ~1,1 kb foi obtido a partir do DNA da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2 (Figura 9), clonado no vetor multicópia pPGK e inserido na *S. cerevisiae* CENPK 2-1C. Também foram utilizados os primers XDH-*Sp*-F e XDH-*Sp*-R com o DNA das linhagens *S. passalidarum* HMD 1.3 e *S. arborariae* HM 19.1a, porém nenhum amplificado foi obtido.



**Figura 9. Amplificação por PCR do gene, que codifica para a xilitol desidrogenase, a partir de linhagem *S. passalidarum*.** O produto de PCR do fragmento que corresponde a enzima XDH a partir de *S. passalidarum* HMD 16.2 foi analisada em gel de agarose 1% e corada com brometo de etídeo.

Da mesma forma, com a utilização dos primers XDH<sub>tef</sub>-*Sp*-F e XDH<sub>tef</sub>-*Sp*-R (Tabela 2), um fragmento de ~1,1 kb foi obtido a partir do DNA da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2 (dado não mostrado), clonado no vetor multicópia pTEF-423 e inserido, juntamente com o vetor pPGK-XR2, pPGK-XR3 ou pPGK-XR4, em *S. cerevisiae*, obtendo os transformantes AMY-2-6, AMY-3-6 e AMY-4-6 (Figura 1).

O genoma da levedura *S. arborariae*, utilizado neste estudo, foi sequenciado pelo nosso grupo, em colaboração com a Embrapa Informática Agropecuária (Campinas, SP), Laboratório Nacional de Computação Científica (Petrópolis, RJ), Departamento de Ciências Biológicas – USP (Piracicaba, SP) e Departamento de Bioquímica e Microbiologia – UFMG (Belo Horizonte, MG) e depositado em DDBJ/EMBL/GenBank under (NCBI), sob o número de acesso AYLH00000000 (Lobo et al., 2014).

#### 4.3 SEQUÊNCIAMENTO DOS GENES CODIFICANTES PARA XILOSE REDUTASES E XILITOL DESIDROGENASE.

O sequenciamento dos genes codificantes para a enzima xilose redutase das linhagens *S. arborariae* HM 19.1a, *S. passalidarum* HMD 1.3 e *S. passalidarum* HMD 16.2, foi analisado através de programas de bioinformática. Esses três genes mostraram sequências de 318 aminoácidos. Embora essas três sequências tenham sido amplificadas a partir de um único par de primers, procedente do genoma da *S. arborariae*, existe uma identidade de 93% quando comparamos os genes entre *S. arborariae* e *S. passalidarum*. Entre os genes provenientes das duas linhagens de *S. passalidarum* HMD 16.2 e HMD 1.3, a identidade foi de 100%.

Da mesma forma, o sequenciamento do gene codificante da enzima xilitol desidrogenase proveniente da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, mostrou uma sequência de 362 aminoácidos. O alinhamento desta sequência com a sequência anotadas como xilitol desidrogenase, proveniente das linhagens de *S. passalidarum* (XYL2.2), apresentou 98% de identidade.

#### 4.4 ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTES.

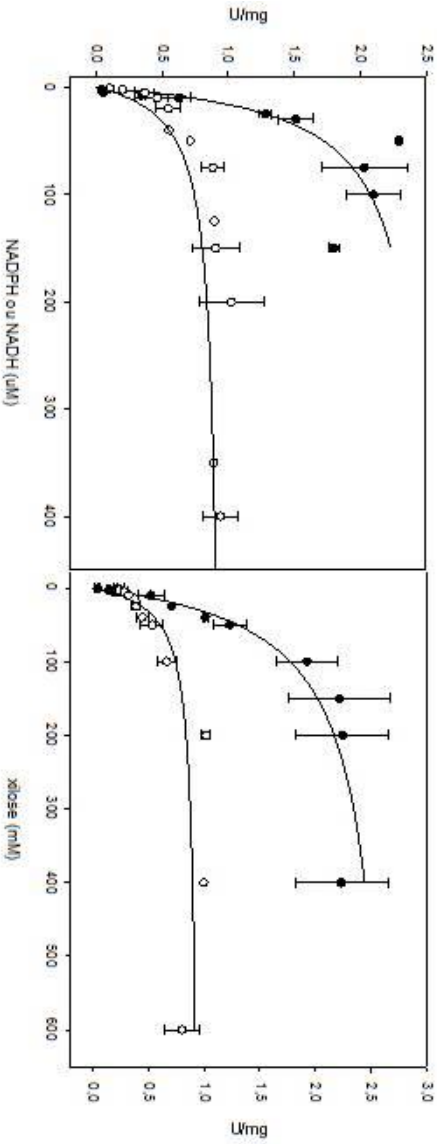
Como pode ser visto na Tabela 5, os genes clonados a partir de *S. passalidarum* tiveram significativa atividade de XR dependente do substrato NADPH, mas praticamente nenhuma atividade com NADH. Embora as linhagens de *S. passalidarum* apresentaram atividade com ambos os cofatores, os genes clonados não mostraram a mesma atividade, enquanto que a xilose redutase clonada a partir de *S. arborariae* teve uma atividade NADH-dependente que corresponde a ~30% da atividade medida com NADPH, se mostrando bastante similar às atividades encontradas na linhagem de *S. arborariae* crescidas em xilose.

**Tabela 5. Atividade específica de XR em leveduras.**

Leveduras <sup>a</sup> :	Plasmídeo:	XR atividade específica (U [mg proteína] <sup>-1</sup> ) com:	
		NADPH	NADH
<i>S. arborariae</i> HM 19.1a	–	0,45±0,01	0,12±0,01
<i>S. passalidarum</i> HMD 1.3	–	0,38±0,02	0,27±0,01
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	–	0,59±0,02	0,38±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY-1	pPGK	0,03±0,01	0,03±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY-2	pPGK-XR2	1,52±0,20	0,05±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY-3	pPGK-XR3	4,09±0,67	0,06±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY-4	pPGK-XR4	2,66±0,02	0,81±0,30

<sup>a</sup> As linhagens de *Spathaspora* foram crescidas em meio YP rico contendo 2% de xilose, enquanto as linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio sintético sem a base uracila e contendo 2% de glicose.

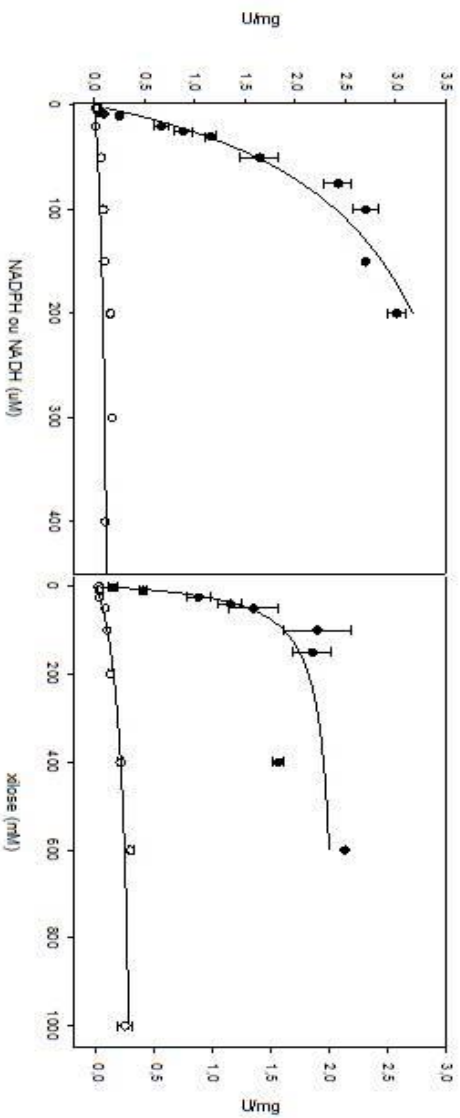
A análise cinética da xilose redutase de *S. arborariae* expressa na levedura *S. cerevisiae* (linhagem AMY-4, Figura 10) revelou que a enzima apresentou alta afinidade pelo NADPH, e maior afinidade pelo NADH. Embora a afinidade da xilose redutase pelo NADPH ser aproximadamente duas vezes menor do que a afinidade para o NADH, a velocidade máxima foi maior quando a enzima utilizou NADPH, em relação ao NADH. A enzima apresentou média afinidade para xilose quando utilizada tanto com o substrato NADPH como com NADH, embora também tenha mostrado maior afinidade pela xilose quando utilizada juntamente com o substrato NADH em relação ao NADPH e velocidade máxima de 2,79 U/mg e 0,96 U/mg, utilizando NADPH e NADH, respectivamente (Figura 10; Tabela 7).



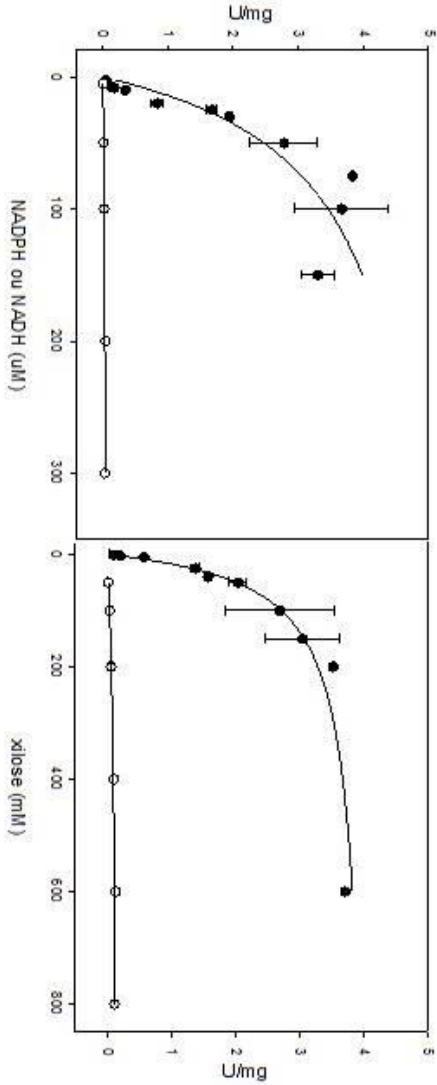
**Figura 10. Análise cinética da enzima xilose redutase de *S. arborariae* H.M. 19.1a expressa na levedura *S. cerevisiae* CENPK 2 1-C (AMY-4). A atividade da xilose redutase acoplada a NADH (branco) e NADPH (preto) em diferentes concentrações de cofator (esquerda), e em diferentes concentrações de xilose (direita), foram determinadas conforme descrito em matérias e métodos.**



Diferente da *S. cerevisiae* transformante contendo a enzima xilose redutase da levedura *S. arborariae* (linhagem AMY-4), os resultados das duas transformantes contendo a enzima xilose redutase da levedura *S. passalidarum* (linhagens AMY-2 e AMY-3, Tabela 1), embora tenham mostrado alta afinidade utilizando o substrato NADPH, utilizando o substrato NADH não foi possível determinar o seu  $K_m$ , uma vez que a velocidade máxima desta enzima mostrou valores muito baixos quando utilizou NADH. Em relação a afinidade por xilose, as enzimas de ambas as espécies, apresentaram média afinidade pela xilose, utilizando NADPH e devido a baixíssima atividade desta enzima utilizando o substrato NADH, também não foi possível determinar os parâmetros cinéticos. (Figura 11; Figura 12; Tabela 7).



**Figura 12. Análise cinética das enzimas xilose redutase de *S. passalidarum* HMD 1.3 expressa na levedura *S. cerevisiae* CENPK 2 1-C (AMY-2).** A atividade da xilose redutase acoplada a NADH (branco) e NADPH (preto) em diferentes concentrações de cofator (esquerda), e em diferentes concentrações de xilose (direita), foram determinadas conforme descrito em matérias e métodos.



**Figura 13. Análise cinética das enzimas xilose redutase de *S. passalidarum* HMD 16.2 expressa na levedura *S. cerevisiae* CENPK 2 1-C (AMY-3). A atividade da xilose redutase acoplada a NADH (branco) e NADPH (preto) em diferentes concentrações de cofator (esquerda), e em diferentes concentrações de xilose (direita), foram determinadas conforme descrito em matérias e métodos.**

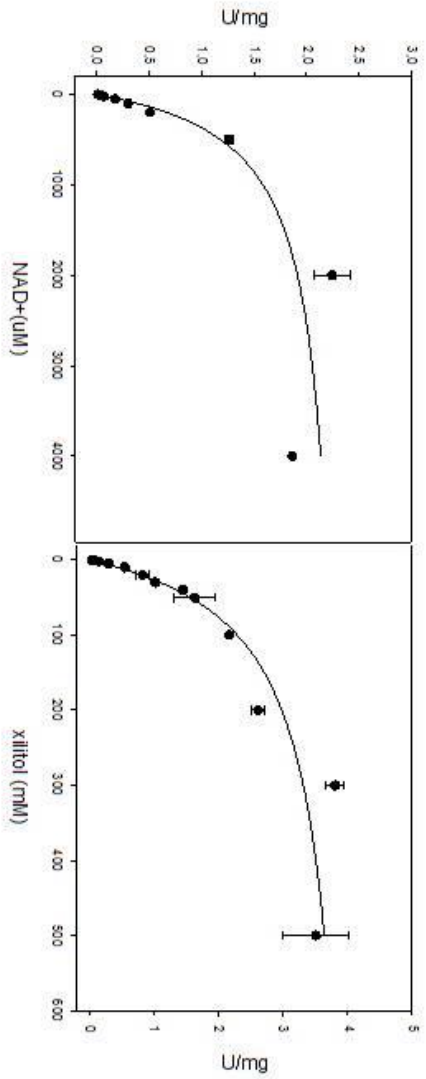
Igualmente a estratégia realizada para a clonagem e expressão das XRs, a enzima xilitol desidrogenase da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, foi clonada em plasmídeo PGK e expressa na levedura *S. cerevisiae* CENPK 2-1C. Conforme Tabela 6, assim como na linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, essa XDH mostrou significativa atividade utilizando o cofator  $\text{NAD}^+$ , e nenhuma atividade utilizando o cofator  $\text{NADP}^+$ .

**Tabela 6. Atividade específica de XDH em leveduras.**

Levedura <sup>a</sup> :	Plasmídeo:	Atividade específica de XDH (U [mg proteína] <sup>-1</sup> ) com:	
		$\text{NADP}^+$	$\text{NAD}^+$
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	—	0,003±0,0	1,29±0,05
<i>S. cerevisiae</i> AMY-1	pPGK	0,01±0,01	0,01±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY-5	pPGK-XDH	----	2,20±0,21

<sup>a</sup>As linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio sintético sem a base uracila e contendo 2% de glicose.

A análise dos parâmetros cinéticos da enzima xilitol desidrogenase da levedura *S. passalidarum* expressa em *S. cerevisiae* (linhagem AMY-5) mostrou uma enzima apresentando baixa afinidade tanto pelo xilitol quanto pelo  $\text{NAD}^+$ , e velocidade máxima por volta de 2,4 U/mg e 4,26 U/mg utilizando diferentes concentrações de cofator  $\text{NAD}^+$  e xilitol, respectivamente (Figura 13; Tabela 7).



**Figura 14. Análise cinética da enzima xilitol desidrogenase de *S. passalidarum* HMD 16.2 expressa na levedura *S. cerevisiae* CENPK 2 1-C (AMY-5). A atividade da enzima xilitol desidrogenase utilizando diferentes concentrações de NAD<sup>+</sup> (esquerda) e diferentes concentrações de xilitol (direita), foram determinadas conforme descrito em matérias e métodos.**

**Tabela 7. Análise cinética das enzimas XR e XDH clonadas e expressas em *S. cerevisiae*.**

Levedura	Xilose Redutase							
	NADPH		NADH		Xilose (NADPH)		Xilose (NADH)	
	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$
AMY-2	94,0 ±24	4,7± 0,6	---	---	30,3± 8	2,1±0,1	---	---
AMY-3	65,9 ±28	5,7± 1,2	---	---	53,3± 6	4,2±0,1	---	---
AMY-4	26,1 ±11	2,6± 0,4	12,80 ±3	1,0±0, 04	57,5± 10	2,8±0,2	29,5 ±13	1,0±0, 1
Levedura	Xilitol Desidrogenase							
	NAD <sup>+</sup> *				Xilitol			
	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$K_m^a$	$V_{max}^b$
AMY-5	521,3±155		2,4±0,2		86,0±13		4,3±0,2	

<sup>a</sup>Afinidade da enzima, em  $\mu\text{M}$  para NADH/NADPH, e mM para xilose.

<sup>b</sup>Velocidade máxima da enzima, em U/mg de proteína.

Igualmente, após a clonagem dos plasmídeos pTEF423 e pPGK na levedura *S. cerevisiae* ASY-1, as atividades de XR e XDH foram medidas nas *S. cerevisiae* recombinantes AMY 2-6, AMY 3-6 e AMY 4-6 (Tabela 8). Ao compararmos os valores de atividade de XR utilizando NADPH e NADH das *S. cerevisiae* AMY-4 e AMY 4-6, encontramos as mesmas atividades. Porém, os valores de atividade utilizando NADPH das *S. cerevisiae* recombinantes AMY 2-6 e AMY 3-6 mostram-se menores em relação aos valores obtidos com as *S. cerevisiae* recombinantes AMY-2 e AMY-3, mesmo sob a expressão do mesmo plasmídeo pPGK.

As atividades de XDH das *S. cerevisiae* recombinantes AMY 2-6, AMY 3-6 e AMY 4-6 mostram que esta enzima sob a expressão do plasmídeo pTEF-423 apresenta uma atividade muito menor em relação a atividade mostrada sob a expressão do plasmídeo pPGK, presente nas *S. cerevisiae* recombinante AMY-5 (2,2 U/mg).

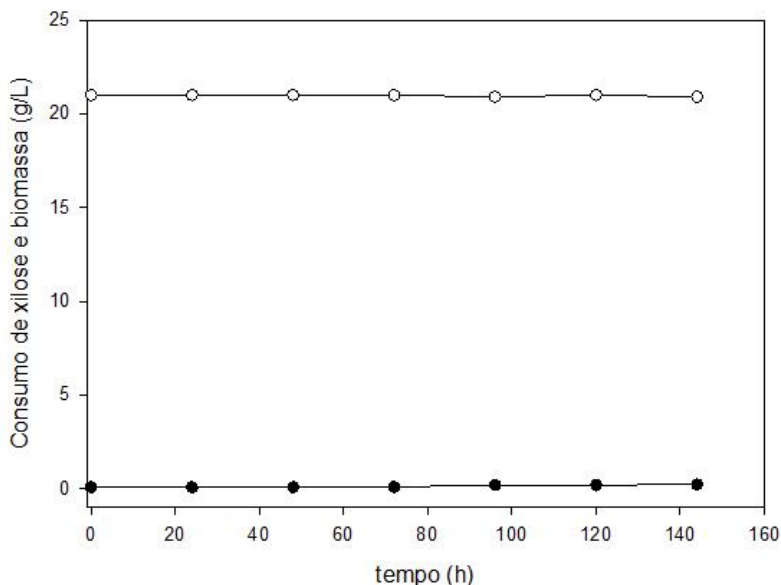
**Tabela 8. Atividade específica de XR e XDH em leveduras.**

Levedura <sup>a</sup> :	Plasmídeo:	Atividade específica (U [mg proteína] <sup>-1</sup> ) com:		
		Xilose redutase		Xilitol desidrogenase
		NADPH	NADH	NAD <sup>+</sup>
<i>S. cerevisiae</i> AMY 2-6	pPGK-XR2; pTEF423-XDH1	3,0±0,01	0,05±0,00	0,38±0,01
<i>S. cerevisiae</i> AMY 3-6	pPGK-XR3; pTEF423-XDH1	3,2±0,17	0,06±0,00	0,35±0,08
<i>S. cerevisiae</i> AMY 4-6	pPGK-XR4; pTEF423-XDH1	2,7±0,02	0,8±0,06	0,33±0,04

<sup>a</sup> As linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio sintético sem a base uracila e histidina e contendo 2% de glicose.

#### 4.5 CRESCIMENTO CELULAR E FERMENTAÇÕES EM BATELADA DAS LINHAGENS TRANSFORMANTES.

Com base no crescimento da levedura *S. cerevisiae* CENPK 2-1C em meio sintético completo e 2% de xilose, foi possível constatar que a ausência dos genes do metabolismo da xilose heterólogos, impossibilita o consumo de xilose, além do seu crescimento nesta fonte de carbono e portanto, sem a produção de etanol, ácido acético, xilitol e glicerol (Figura 14).



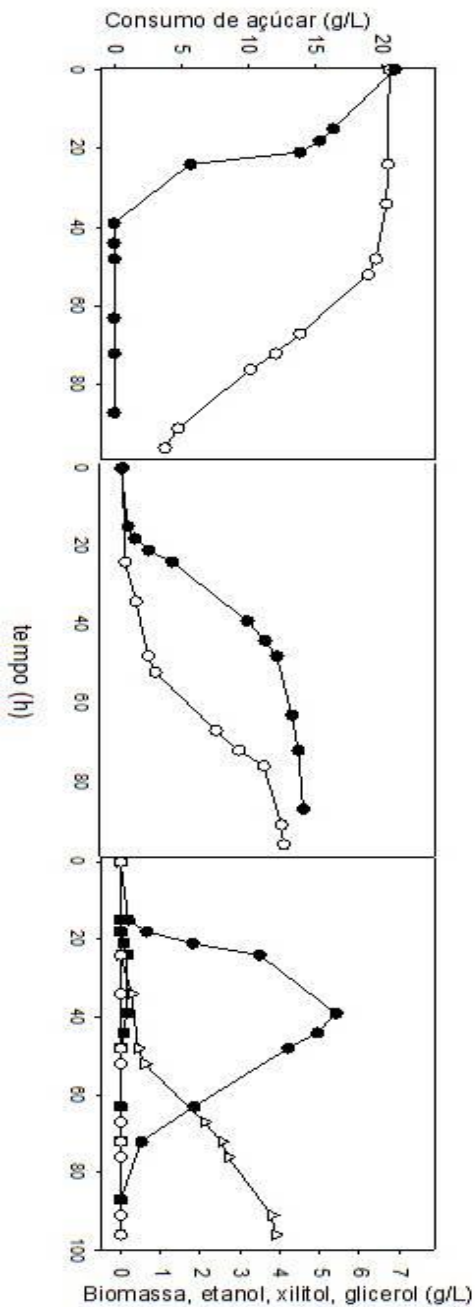
**Figura 15. Consumo de xilose e crescimento celular em *S. cerevisiae* CENPK 2-1C.** Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas da cultura para a determinação do consumo de açúcares (branco), crescimento celular (preto). Não foram detectados presença de etanol, xilitol e glicerol.

Com o intuito de avaliar o perfil de consumo de açúcar, bem como a produção de biomassa e metabólitos (etanol, glicerol e xilitol), a Figura 15 e 16 mostram o crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol, xilitol e glicerol, analisados em duas fontes de carbono (xilose e glicose), das linhagens *S. cerevisiae* AMY 2-6 e AMY 4-6. Uma vez que as *S. cerevisiae* transformantes contendo a enzima xilose redutase de *S. passalidarum* (AMY 2-6 e AMY 3-6) apresentam 100% de identidade em sua sequência de aminoácidos e embora analisados os parâmetros de crescimento e fermentação das duas *S. cerevisiae* recombinantes AMY 2-6 e AMY 3-6, serão apresentados somente os resultados da *S. cerevisiae* AMY 2-6.

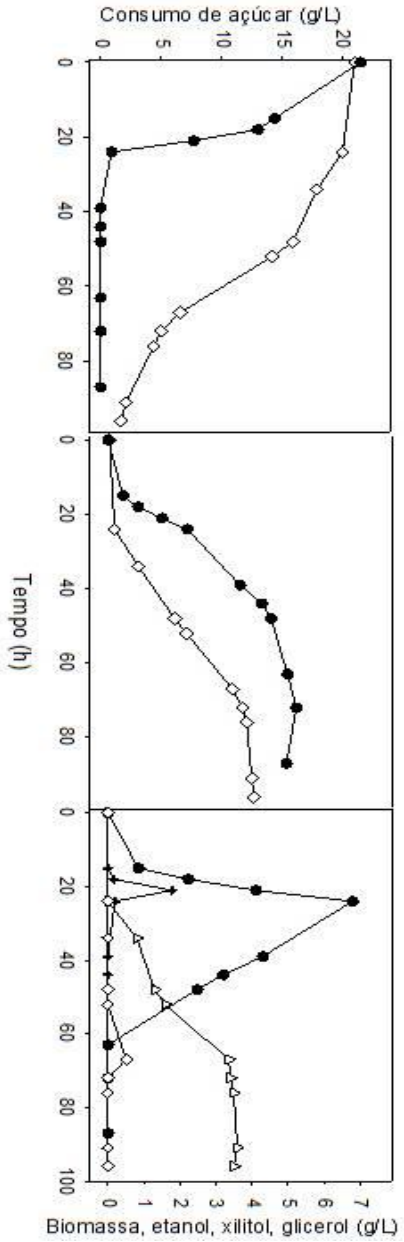
Em meio contendo apenas glicose, as linhagens transformantes foram capazes de fermentar a glicose, com consumo em aproximadamente 24 horas, produção de glicerol de 0,1-1,7 g/L e produção de etanol de 6-7 g/L. Em meio contendo apenas xilose, as mesmas mostraram lento consumo de xilose com uma grande fase lag,



onde a linhagem contendo a XR de *S. passalidarum* (AMY 2-6) entrou na fase exponencial em ~50 horas, para então apresentar crescimento expressivo. O consumo de xilose, exibiu a mesma tendência, passando a consumir xilose mais rapidamente somente depois das 50 horas e ao longo de 96 horas o açúcar residual foi de 3,8 g/L. A linhagem contendo a XR de *S. arborariae* (AMY 4-6), demonstrou um crescimento celular e consumo de xilose mais acentuado em relação a linhagem AMY 2-6, iniciando a sua fase exponencial de crescimento depois de 24 horas, consumindo ~7 g/L nas primeiras 50 horas e ao longo de 96 horas deixando 1,7 g/L de açúcar residual. A velocidade de consumo máximo de xilose e o consumo de xilose em porcentagem, também demonstrou maiores valores para a linhagem *S. cerevisiae* AMY 4-6, em relação a linhagem *S. cerevisiae* AMY 2-3 (Tabela 9). Quanto a produção de metabólitos, houve elevada produção de xilitol para as duas linhagens de 3,5-3,9 e a pequena produção de etanol de ~ 1g/L para a linhagem *S. cerevisiae* AMY 4-6. Não foi observado produção de etanol para a linhagem *S. cerevisiae* AMY 2-6 e não foi observado produção de ácido acético e glicerol para as 2 linhagens (Figura 15 e 16).



**Figura 16. Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol, xilitol, glicerol pela linhagem *S. cerevisiae* AMY 2-6 durante o crescimento em glicose ou xilose.** Nos tempos indicados, aliquotas foram retiradas da cultura para a determinação do consumo de açúcares (painel a esquerda), crescimento celular (painel central) e produção de etanol, xilitol e glicerol (painel a direita) em meio sintético contendo 2% de glicose (preto) ou 2% de xilose (branco). As produções de xilitol (em meio contendo xilose) e glicerol (em meio contendo glicose) e etanol (em meio contendo xilose ou glicose) estão representados em triângulos, quadrados e círculos, respectivamente.



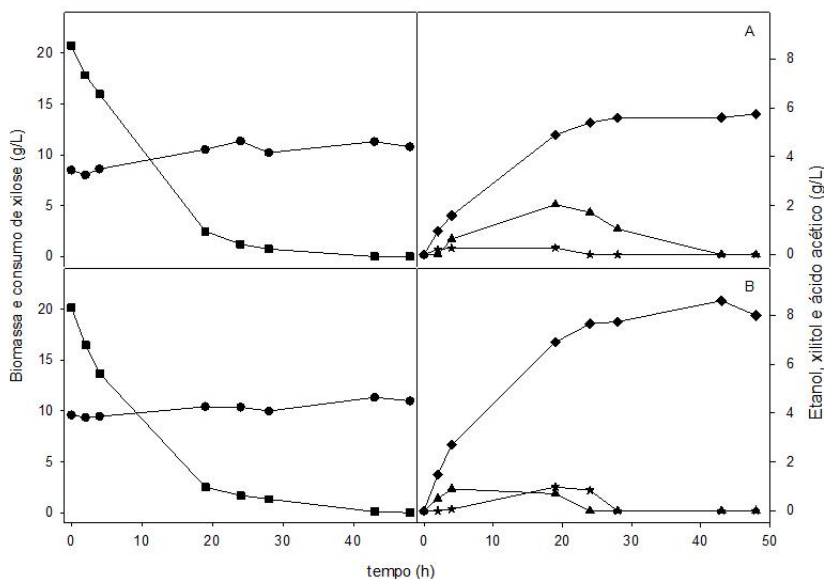
**Figura 17. Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol, xilitol, glicerol em *S. cerevisiae* AMY 4-6, durante o crescimento em glicose ou xilose.** Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas da cultura para a determinação do consumo de açúcares (painel a esquerda), crescimento celular (painel central) e produção de etanol, xilitol e glicerol (painel a direita) em meio sintético contendo 2% de glicose (preto) ou 2% de xilose (branco). As produções de xilitol (em meio contendo xilose) e glicerol (em meio contendo glicose) e etanol (em meio contendo xilose ou glicose) estão representados em triângulos.

**Tabela 9. Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em xilose pelas linhagens transformantes *S. cerevisiae*.**

Levedura <sup>a</sup>	Consumo de xilose (%)	$V_s$ (g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_e$ (g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{e/s}$ (g/g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i> AMY 2-6	81,6	0,17	0	0
<i>S. cerevisiae</i> AMY 4-6	92	0,2	0,01	0,03

<sup>a</sup> Os crescimentos foram realizados em meio sintético, contendo 2% de xilose como fonte de carbono. <sup>b</sup> consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> rendimento em gramas de etanol produzido por g de substrato consumido.

Nos ensaios de fermentação em batelada em condições microaeróbicas, com 20 g/L de xilose, as duas linhagens de *S. cerevisiae*, dentro de 24 hs, atingiram quase a depleção de xilose no meio e exibiram produção de etanol de 1,8-2,0 g/L. Houve acentuada produção de xilitol pelas duas linhagens, com *S. cerevisiae* AMY 4-6 exibindo maior produção em relação a *S. cerevisiae* AMY 2-6. As duas *S. cerevisiae* recombinantes mostraram pequena produção de ácido acético de não mais que 1 g/L e não houve produção de glicerol nas 2 linhagens deste estudo. Depois de aproximadamente 20 horas, no momento em que a xilose residual passou a ser por volta de 3 g/L, o etanol passou a ser consumido nas 2 linhagens. Ao final de 48 horas, o consumo de xilose foi de 100% (Figura 17; Tabela 10). Enquanto a velocidade de consumo máximo de xilose foi ligeiramente maior para *S. cerevisiae* AMY 4-6, em relação a AMY 2-6, a produção volumétrica máxima de etanol foi aproximadamente o dobro para *S. cerevisiae* AMY 2-6, em relação a *S. cerevisiae* AMY 4-6 (Tabela 10). E embora tenha sido possível visualizar pequena produção de etanol e nenhuma produção de etanol nas *S. cerevisiae* AMY 4-6 e AMY 2-6, respectivamente, durante o crescimento em xilose, quando observamos as produções de etanol obtidas durante a fermentação em batelada em xilose, vemos uma maior produção de etanol na *S. cerevisiae* AMY 2-6, em relação a AMY 4-6. Esses dados sugerem possivelmente que o pico de produção de etanol por parte de *S. cerevisiae* AMY 4-6 não esteja representado, uma vez que o consumo de açúcar por parte desta levedura foi mais rápido, quando comparado com *S. cerevisiae* AMY 2-6.



**Figura 18. Fermentação em batelada contendo 20 g/L de xilose pelas linhagens de leveduras modificadas.** As linhagens de *S. cerevisiae* AMY 2-6 (A) e AMY 4-6 (B), pré-crescidas em meio sintético contendo 2% de glicose, foram utilizados para fermentar em meio sintético contendo 2% de xilose. Nos tempos indicados, foram retiradas alíquotas da cultura para a determinação de consumo de açúcar (quadrado), crescimento celular (círculo), produção de ácido acético (estrela), etanol (triângulo) e xilitol (losango).

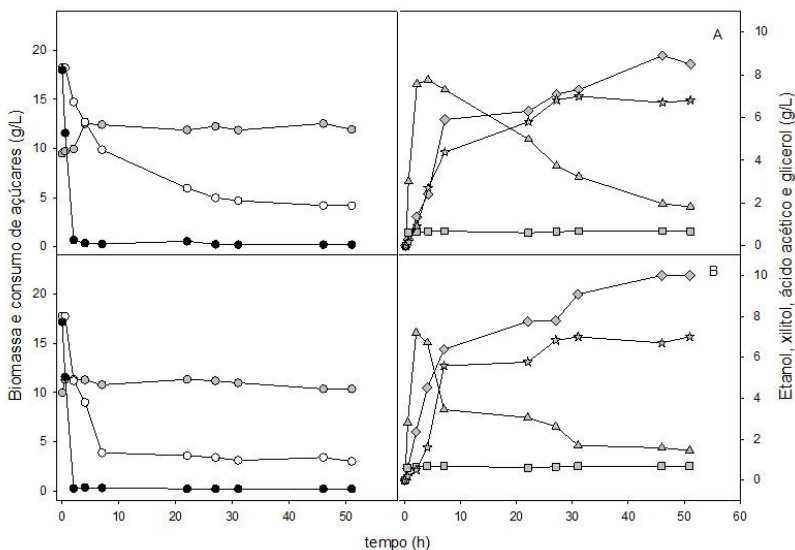
**Tabela 10. Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em batelada em xilose pelas linhagens transformantes *S. cerevisiae*.**

Levedura <sup>a</sup>	Consumo de xilose (%)	$V_s$ (g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_e$ (g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{e/s}$ (g/g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i> AMY 2-6	100	0,43	0,11	0,11
<i>S. cerevisiae</i> AMY 4-6	100	0,42	0,05	0,05

<sup>a</sup> As fermentações foram realizados em meio sintético, contendo 2% de xilose como fonte de carbono. <sup>b</sup> consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> rendimento em gramas de etanol produzido por g de substrato consumido.

Os ensaios de co-fermentação em batelada, utilizando 2% de xilose e 2% de glicose, em condições microaeróbicas, mostraram que enquanto as 2 linhagens consumiram rapidamente a glicose, em aproximadamente 2 horas, a xilose presente no meio foi mais lentamente consumida e ao final de 55 horas, apresentando xilose residual de 3,0-4,2 g/L. Na Tabela 11, podemos observar que a *S. cerevisiae* AMY 4-6 mostrou maior consumo em porcentagem e consumo volumétrico máximo de xilose, produção volumétrica máxima de etanol e rendimento em gramas de etanol, em relação a *S. cerevisiae* AMY 2-6. Tais valores podem ser atribuídos a xilose, que embora consumida mais lentamente (em relação a fermentação em batelada contendo apenas xilose) mostrou consumir xilose juntamente com glicose, onde a linhagem *S. cerevisiae* AMY 4-6 apresentou esse co-consumo de forma mais expressiva e com produção volumétrica máxima de etanol também mais expressiva em relação a linhagem AMY 2-6 (Figura 18; Tabela 11).

Em relação aos outros produtos obtidos nas fermentações, vemos um considerável aumento de ácido acético quando estas linhagens transformantes passam a co-fermentar glicose e xilose, onde não mais que 0,5 g/L foi produzido durante a fermentação de glicose e mais que 6 g/L passam a ser produzidos ao final de 50 horas de fermentação para as 2 linhagens transformantes. Assim como, a produção de glicerol permaneceu pequena (menor que 1 g/L) nas co-fermentações.



**Figura 19. Co-fermentação em batelada contendo 20 g/L de glicose 20 g/L de xilose pelas linhagens de leveduras modificadas.** As linhagens de *S. cerevisiae* AMY 2-6 (A) e AMY 4-6 (B), pré-crescidas em meio sintético contendo 2% de glicose, foram utilizados para fermentar em meio sintético contendo 2% de xilose e 2% de glicose. Nos tempos indicados, foram retiradas alíquotas da cultura para a determinação de consumo de glicose (círculo preto), consumo de xilose (círculo branco), crescimento celular (círculo cinza) e produção de etanol (triângulo cinza) e xilitol (losango cinza), glicerol (quadrado cinza) e ácido acético (estrela cinza).

**Tabela 11. Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações em batelada em xilose e glicose pelas linhagens transformantes *S. cerevisiae*.**

Levedura <sup>a</sup>	Consumo de xilose (%)	$V_s$ ( $\text{g}^{-1}\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$V_e$ ( $\text{g}^{-1}\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$Y_{e/s}$ ( $\text{g/g}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i> AMY 2-6	78,6	0,26	1,04	0,27
<i>S. cerevisiae</i> AMY 4-6	84,3	0,27	3,59	0,30

<sup>a</sup> As fermentações foram realizados em meio sintético, contendo 2% de glicose e 2% de xilose como fonte de carbono. <sup>b</sup> consumo volumétrico máximo de açúcar.

<sup>c</sup> produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> rendimento em gramas de etanol produzido por g de substrato consumido.



## 5 DISCUSSÃO

Nossa estratégia inicial, baseada na anotação automática do genoma da *S. arborariae* (Lobo et al., 2014) que mostrou a presença de um possível gene para “xilose redutase” no genoma desta levedura, acabou revelando uma proteína (obtida de *S. arborariae* e *S. passalidarum*) sem nenhuma atividade XR, quando expressa em *S. cerevisiae*, indicando que seria uma aldo/ceto redutase com especificidade desconhecida presente nesse clado de leveduras *Spathaspora*. Aldo/ceto redutases tem significativa identidade com outras redutases fúngicas, e este gene também mostrou, por exemplo, significativa homologia (identidade de 52%) com a enzima glicerol desidrogenase codificada pelo gene *GSY1* de *S. cerevisiae*. Devido ao vasto número de membros na família aldo/ceto redutases, é difícil prever o real substrato de determinada proteína baseada em sua homologia de sequência.

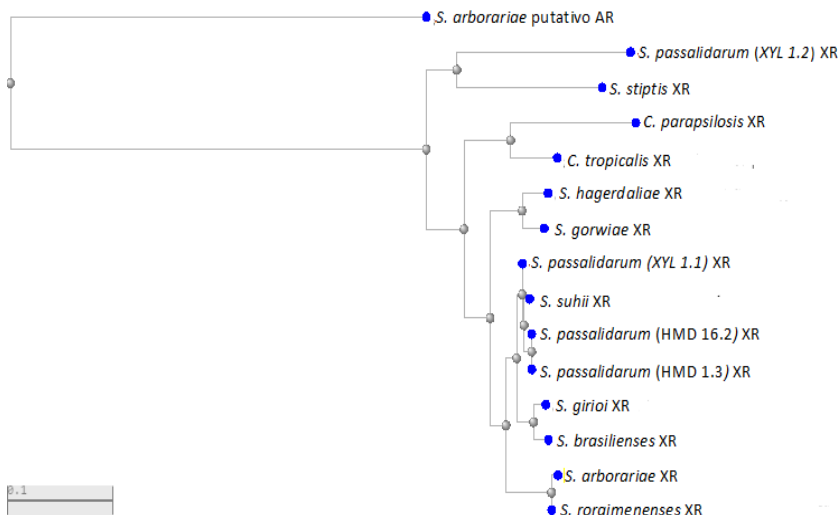
Por exemplo, *S. cerevisiae* tem seis aldose redutases (AR) envolvidas na conversão de xilose a xilitol, e entre essas, o gene *GRE3* no cromossomo VIII (Garay-Arroyo et al., 1999) é capaz de reduzir xilose a xilitol com uma atividade  $4,5 \pm 0,5$  mU/[mg protein]<sup>-1</sup>, enquanto que a linhagem deletada neste gene (*gre3Δ*) tem uma atividade <1 mU/[mg protein]<sup>-1</sup> (Träff et al., 2001). Yokoyama et al. (1995) mostraram que *C. tropicalis* tem três diferentes XR com nenhuma diferença significativa nas suas propriedades catalíticas, e é sugerido que estas três isoformas são similares em estrutura. Resultados similares tem sido encontrado para *P. tannophilus*, *Aureobasidium pululans* e *Pichia quercuum* (Verduyn et al. 1985; Machová, 1992; Susuki et al., 1975).

Mesmo levando em consideração estes problemas de anotação automática de genomas, obtivemos sucesso na clonagem da XR de *S. arborariae* que apresenta atividade com ambos os cofatores, NADPH e NADH, quando o gene foi expresso em *S. cerevisiae*. Surpreendentemente, o gene homólogo clonado a partir das duas linhagens de *S. passalidarum* mostrou uma XR dependente exclusivamente de NADPH. De fato, durante o desenvolvimento deste trabalho tornou-se evidente que o genoma da *S. passalidarum* tem dois genes responsáveis pela XR, o gene clonado no presente trabalho (denominado *XYL1.1*), e uma segunda XR (gene *XYL1.2*) com preferência pelo substrato NADH, com 318 aminoácidos e 76% e 75% de identidade ao gene XR de *S. passalidarum* e *S. arborariae* clonados e

sequenciado pelo nosso grupo, respectivamente (Wohlbach et al., 2011; Mamoori et al., 2013).

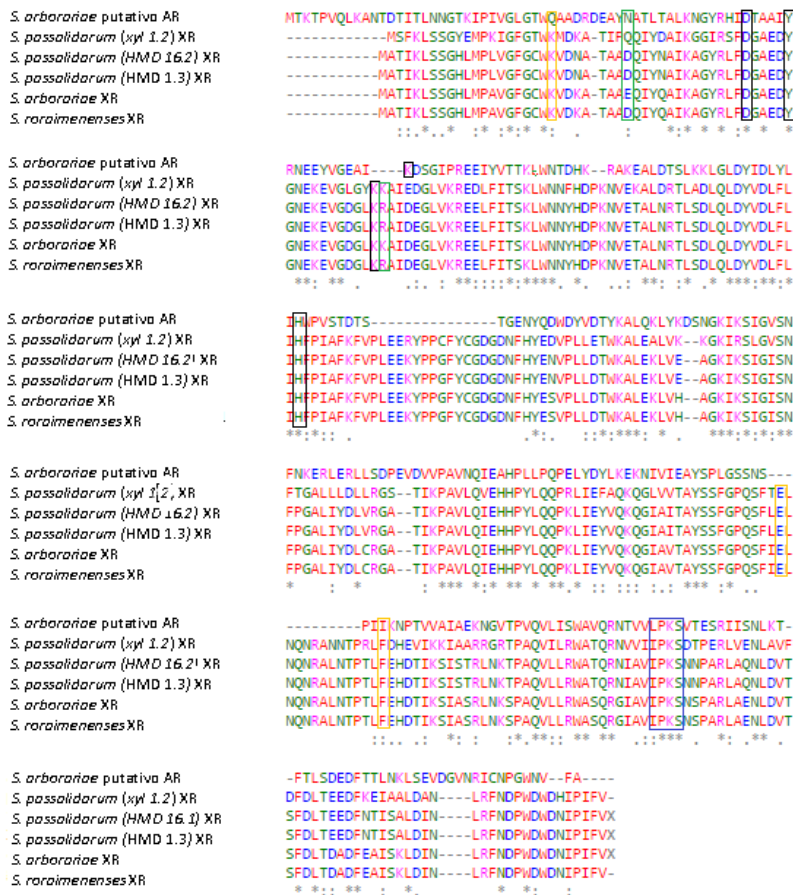
Recentemente, em 2015 Cadete e colaboradores depositaram no NCBI as sequências putativas de xilose redutases e xilitol desidrogenases das linhagens *S. roraimanenses*, *S. suhii* e *S. brasilienses*. No caso das xilose redutases, as mesmas mostram uma identidade com a XR proveniente da linhagem *S. arborariae* clonada no presente trabalho de 99%, 93% e 92%, respectivamente. Apesar da alta homologia, não há nenhum indício experimental que estes genes sejam de fato as XR e XDH responsáveis pela metabolização da xilose nestas leveduras. Mais recentemente, três novas espécies do clado *Spathaspora* foram descritas (*S. girioi*, *S. hagerdaliae* e *S. gorwiae*), sendo que apenas uma delas, *S. gorwiae*, apresentou uma atividade XR com ambos os cofatores (Lopes et al., 2016). Este trabalho também analisou o genoma destas leveduras, e os genes putativos para xilose redutases e xilitol desidrogenases foram anotados e depositados no NCBI (embora novamente a atividade enzimática destas proteínas não foram determinadas experimentalmente). Estas XRs de *S. girioi*, *S. hagerdaliae* e *S. gorwiae* apresentam uma identidade com a xilose redutase de *S. arborariae* de 92%, 88% e 89%, respectivamente.

A Figura 19 mostra a comparação filogenética das proteínas XR clonadas e expressas em *S. cerevisiae* obtidas neste estudo (incluindo a putativa aldo/ceto redutase de *S. arborariae*), juntamente com as sequências anotadas como XRs de outras espécies do clado *Spathaspora*, e XR já conhecidas de outras leveduras. O filograma mostra que as XRs de *S. arborariae* e *S. roraimanenses* são muito próximas, uma vez que estas duas enzimas apresentam 99% de identidade. Próxima a estas XRs, dividindo um mesmo ancestral comum, observamos as XRs de *S. girioi* e *S. brasilienses*, enquanto que as enzimas de *S. passalidarum* clonadas neste trabalho a partir das linhagens HMD 1.3 e HMD 16.2 (que de fato apresentam 100% de identidade), estão agrupadas com as sequências das XRs de *S. suhii* e a *XYL1.1* de *S. passalidarum* (Figura 19). Por outro lado, as XRs de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Butler et al., 2009) e *S. stiptis* (Jeffries et al., 2007) formam um outro grupo mais distante, sendo que a enzima *XYL1.2* de *S. passalidarum* é mais próxima da enzima XR de *S. stiptis*. Finalmente, a sequência da aldo/ceto redutase putativa de *S. arborariae* é bastante distante todas as XRs presentes no filograma, sugerindo que provavelmente seja uma aldo/ceto reductase que não tem a xilose como substrato.



**Figura 20.** Filograma das sequências da aldo/ceto redutase (AR) putativa de *S. arborariae*, com xilose redutases (XR) clonadas neste trabalho de *S. arborariae* e *S. passalidarum* (linhagens HMD 1.3 e HMD 16.2), e as XRs de outras espécies do clado *Spathaspora* e das leveduras *S. stiptis*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

A Figura 20 mostra um alinhamento das sequências das proteínas de *S. arborariae* e *S. passalidarum* clonadas e sequenciadas no presente trabalho, com as sequências das outras XRs das leveduras *S. passalidarum* (XYL1.2), e uma putativa XR da levedura *S. roraimenenses*, todas obtidas no banco de dados do NCBI. O alinhamento múltiplo destas sequências, mostrou muitas regiões de sequências conservadas, como por exemplo a tétrede (Asp<sup>43</sup>; Tyr<sup>48</sup>; Lys<sup>59</sup> e His<sup>110</sup>, numeração baseada na XR de *S. stiptis*, marcados com caixa preta na Figura 20), que formam o sítio catalítico da enzima. Referente aos motivos ligantes de coenzimas, a sequência Ile-Pro-Lys-Ser (IPKS) (marcados com caixa azul na Figura 20) é conservada entre redutases NADPH dependentes, com o resíduo de lisina do motivo envolvido na ligação direta do NADPH (Bohren et al, 1994), enquanto que em xilose reductases NADH-dependentes, como a apresentada por *C. parapsilosis*, esse resíduo lisina é substituído por uma arginina (Lee et al, 2003).



**Figura 21.** Alinhamento das sequências da aldolase (AR) putativa de *S. arborariae*, xilose redutases (XR) de *S. passalidarum* (XYL1.2) e as clonadas das linhagens HMD1.3 e HMD16.2, a XR clonada de *S. arborariae*, e a XR putativa de *S. roraimenenses*. Os aminoácidos estão representados nas cores de acordo com a classificação: ácido, azul; básico rosa; hidrofóbico, vermelho; hidrofílico, verde. As posições dos aminoácidos que compõem a tetrade catalítica, fenda de ligação para NADH (Glu<sup>223</sup> e Phe<sup>236</sup>) e NADPH (Lys<sup>21</sup> e Phe<sup>236</sup>), o motivo IPKS ligante na coenzima e os que diferem entre *S. arborariae* e *S. roraimenenses* estão enquadrados em preto, amarelo, azul e verde, respectivamente.

De fato, a enzima XR com uma mutação contendo uma metionina no lugar da lisina (K270M) em *S. stipitis*, mostrou um decréscimo na afinidade com NADPH de ~16,7 vezes, enquanto que a afinidade desta enzima com NADH permaneceu inalterada (Kostrzynska et al., 1998). Este motivo contendo lisina é conservado não só entre os genes das XRs de *S. arborariae* e *S. passalidarum* identificadas no presente trabalho, como também no gene *XYL1.2* de *S. passalidarum*. Portanto, a XR clonada de *S. arborariae* (XR que também usa NADH), bem como a *XYL1.2* de *S. passalidarum* que também aceita os dois cofatores (Mamoori et al., 2013), muito provavelmente utilizam outros resíduos para a ligação do cofator NADH. Por outro lado, é importante salientar que a aldo/ceto redutase clonada de *S. arborariae*, com especificidade desconhecida, tem um diferente aminoácido (Leu substituído por Ile) nesta região.

Como mostrado acima na Figura 7, as linhagens das leveduras *S. roraimanenses*, *S. suhii* e *S. brasilienses* apresentam atividade para xilose redutase dependente exclusivamente de NADPH. Ao compararmos as sequências de *S. roraimanenses* e *S. arborariae*, vemos a diferença de somente dois aminoácidos, tratando-se da troca de um aspartato (Asp<sup>29</sup>) em *S. roraimanenses* pelo glutamato (Glu<sup>29</sup>) em *S. arborariae*, e do aminoácido arginina (Arg<sup>60</sup>) de *S. roraimanenses* pela lisina (Lys<sup>60</sup>) em *S. arborariae* (marcados com caixa verde na Figura 20). Apesar desta mínima diferença, a atividade xilose redutase destas duas leveduras difere consideravelmente. Este resultado sugere que estes dois aminoácidos podem exercer grande diferença em relação a dependência desta enzima pelos substratos NADPH e NADH, principalmente se considerarmos que também encontramos uma lisina (Lys<sup>59</sup>) na xilose reductase *XYL1.2* clonada de *S. passalidarum*, cuja atividade aceita também os dois substratos (Mamoori et al., 2013). O resíduo de aminoácido na posição 29 não se mostrou conservado entre as XRs analisadas, sendo um ácido glutâmico na enzima de *S. arborariae*, e uma glutamina na xilose reductase *XYL1.2* de *S. passalidarum*. Vale ressaltar que os aminoácidos Asp<sup>29</sup> e Arg<sup>60</sup> se encontram conservados nas XRs clonadas de *S. passalidarum*, cuja atividade é NADPH-dependente.

Considerando os aminoácidos Ile<sup>4</sup>, Ser<sup>97</sup>, Ile<sup>188</sup>, Tre<sup>246</sup> e Ser<sup>289</sup>, conservados em todas as XR dependentes de NADPH analisadas neste trabalho (Figura 20), vemos que estes não se encontram conservados nos genes *XYL1.2* de *S. passalidarum* (Figura 20) e no gene anotado como XR na espécie *S. gorwiae* (dados não mostrados), sendo estes substituídos por resíduos de aminoácidos maiores e/ou mais hidrofílicos.

Esses resíduos de aminoácidos possivelmente podem vir a contribuir para a atividade da enzima XR com o cofator NADH.

De acordo com simulações de Molecular Docking, Wang et al. (2007) sugeriu que a fenda de ligação da XR de *S. stipitis* para NADH é formada por 16 resíduos, dos quais Glu<sup>223</sup> e Phe<sup>236</sup> contribui com mais de uma ponte de hidrogênio, enquanto que a fenda de ligação da XR para NADPH é também formada pelos mesmos 16 resíduos, dos quais Lys<sup>21</sup> e Phe<sup>236</sup> são os fortes contribuidores para a ligação de hidrogênio, formando duas pontes de hidrogênios de cada resíduo com o cofator. Este resíduo glutamina (Glu<sup>223</sup>) é conservado em muitas XRs que utilizam NADH, e a deleção deste aminoácido por mutação produz uma XR estritamente dependente de NADPH (Khattab et al., 2011).

Na Figura 20, o resíduo Phe<sup>236</sup> (marcado com caixa amarela na Figura 20) está presentes nos genes das XRs de *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *S. stipitis*. Esta semelhança não é vista em *C. parapsilosis* (Lee et al., 2003), visto que o resíduo Leu<sup>236</sup> substitui o resíduo Phe<sup>236</sup>. O resíduo Glu<sup>223</sup> e Lys<sup>21</sup> são conservados em todas as XR analisadas neste estudo, enquanto que na sequência da putativa aldo/ceto redutase de *S. arborariae* também faltam os resíduos conservados Lys<sup>21</sup>, Phe<sup>236</sup> e Glu<sup>223</sup>, e pode explicar o porquê de não ser detectado nenhuma atividade de XR, quando este gene foi expresso em *S. cerevisiae*.

Outros estudos mostram que os domínios conservados Glu<sup>227</sup>, Lys<sup>274</sup> e Asn<sup>276</sup> de *Candida tenuis* e Glu<sup>224</sup>, Lys<sup>271</sup> e Asn<sup>273</sup> de *Talaromyces emersonii*, são os principais resíduos que mantém contato com as coenzimas, sendo que mutações nestes resíduos podem melhorar a preferência da enzima tanto por NADPH como por NADH (Petschacher et al., 2005; Fernandes et al., 2009).

Todas as XRs sequenciadas neste estudo mostraram que os aminoácidos lisina (Lys<sup>269</sup>), asparagina (Asn<sup>271</sup>) e arginina (Arg<sup>275</sup>), se encontram nas suas respectivas posições conservadas. Ao analisarmos os genes *XYL1.2* de *S. passalidarum* e *XYL1* de *C. parapsilopsis*, vemos que enquanto esses três aminoácidos se encontram também conservados em *C. parapsilosis*, existe a substituição da asparagina pelo aspartato na posição 270 da xilose reductase *XYL1.2* de *S. passalidarum*, indicando então que provavelmente o resíduo do aminoácido aspartato (Asp<sup>270</sup>), que se encontra após o motivo IPKS, também esteja relacionado com a melhor utilização de NADH pela enzima *XYL1.2* de *S. passalidarum* (Mamoori et al., 2013).

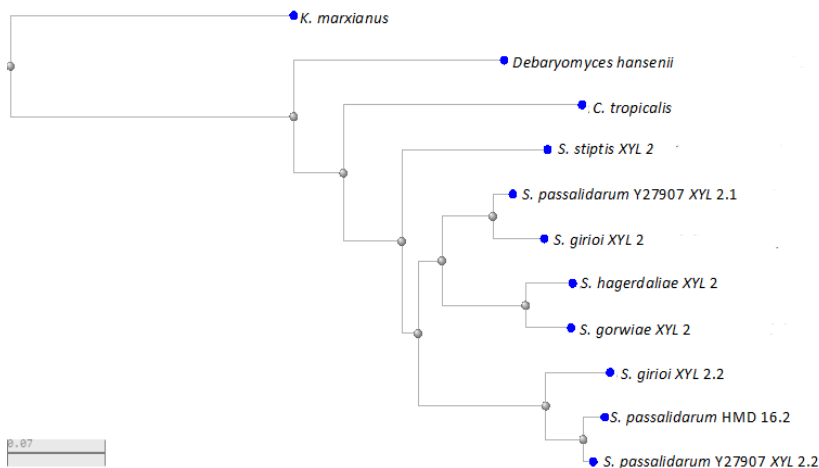
Obtivemos também sucesso na clonagem e expressão em *S. cerevisiae* da enzima xilitol desidrogenase de *S. passalidarum*, cuja sequência de 362 aminoácidos foi obtida a partir do genoma já

conhecido de *S. passalidarum* (Wohlbach et al., 2011). Esta XDH expressa em *S. cerevisiae* exibiu alta atividade e estrita dependência ao cofator  $\text{NAD}^+$ , condizente com os resultados da atividade xilitol desidrogenase encontrada nas várias espécies de *Spathaspora* (Figura 7 acima). No entanto, uma análise do genoma das leveduras *Spathaspora* realizado recentemente por Cadete e colaboradores (genes depositados no NCBI) revelou que *S. passalidarum* possui dois genes putativos para a enzima XDH: um gene que codifica para uma proteína de 364 aminoácidos que passou a ser denominada *XYL2.1*, e a enzima que foi clonada e expressa no presente trabalho (362 aa) que foi denominada *XYL2.2*. É importante salientar que recentemente o gene *XYL2.1* foi clonado e expresso em *S. cerevisiae*, revelando uma XDH também  $\text{NAD}^+$ -dependente (Mamoori et al., 2014).

Segundo Lopes et al. (2016), dentro do clado *Spathaspora* tem algumas leveduras que apresentam dois genes (*XYL2.1* e *XYL2.2*) para a XDH, incluindo as espécies *S. girioi*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*, enquanto que outras leveduras aparentemente contêm somente uma única cópia (*XYL2*) no seu genoma, como as espécies *S. hagerdaliae* e *S. gorwiae*. No entanto, nós não identificamos nenhuma sequência com significativa similaridade a XDH no genoma anotado de *S. arborariae* disponível no NCBI (Lobo et al., 2014). As enzimas xilitol desidrogenases codificadas pelos genes *XYL2* e *XYL2.1* são altamente conservadas entre as espécies *Spathaspora*, com identidade de proteínas entre 84% a 96%. A segunda xilitol desidrogenase (codificada por *XYL2.2*), difere em 20 aminoácidos quando sua sequência é comparada às enzimas codificadas por *XYL2* e *XYL2.1* das outras espécies de *Spathaspora* (Lopes et al., 2016).

A Figura 21 mostra a comparação filogenética da proteína XDH clonada e expressa em *S. cerevisiae*, obtida no presente trabalho a partir da linhagem *S. passalidarum* HMD 16.2, com as sequências de XDHs obtidas no banco de dados do NCBI, incluindo as enzimas presentes em *K. marxianus* (Lulu et al., 2013), *D. hansenii*, *C. tenuis* (Wohlbach et al., 2011), *C. tropicalis*, *S. stiptis*, e várias XDH putativas de espécies do clado *Spathaspora*. A XDH clonada da linhagem de *S. passalidarum* HMD 16.2 apresenta uma identidade de 98% com a XR codificada pelo gene *XYL2.2*, e é próxima também à XDH codificada pelo gene *XYL2.2* de *S. girioi* (identidade de 91% com a XDH de *S. passalidarum* HMD 16.2). Em um outro agrupamento temos as sequências das xilitol desidrogenases codificadas pelos genes *XYL2* de *S. gorwiae* e *S. hagerdaliae*, e *XYL2.1* de *S. girioi* e *S. passalidarum*, com 78%, 78%, 81% e 83% de identidade. Mais distantes, temos as

sequências de *S. stiptis*, *C. tropicalis*, *D. hansenii* e *K. marxianus* com identidades de 77%, 71%, 69% e 51%, respectivamente, ao gene clonado no presente trabalho.



**Figura 22.** Filograma das sequências de xilitol desidrogenase de *K. marxianus*, *D. hansenii*, *C. tenuis*, *C. tropicalis*, *S. stiptis*, *S. passalidarum* (incluindo aa clonada a partir da linhagem HMD 16.2), e de outras espécies do clado *Spathaspora*.

A Figura 22 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos das xilitol desidrogenases da levedura *S. passalidarum* clonada e sequenciada neste trabalho, com as sequências anotadas e obtidas pelo banco de dados NCBI das leveduras *D. hansenii* (Dujon et al., 2004), *C. tropicalis* (Boontham et al., 2012), *S. stiptis* (Jeffries et al., 2007) e *S. passalidarum* (XYL2.1 e XYL2.2) (Wohlbach et al., 2011). Todas as sequências mostram os aminoácidos Cys<sup>41</sup>, His<sup>66</sup> e Glu<sup>67</sup> conservados (marcado com caixa preta na Figura 21) que compõem um sítio ligante de zinco, parte do sítio catalítico da enzima.



<i>Debaryomyces hansenii</i>	MTPNPSLVLNKINDISFEKYDAPEITEPNQDVIVEVKKTGICSSDIHYHTGAIGGFIKLS
<i>C. tropicalis</i>	MTANPSVLNKKDDISFEYEAAPKLESPPRDVIVEVKKAGICSSDIHYAHGSGPFIIRK
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	MVANPSVLNKKIDEIVFENQEAPTITEPTDVIQVVKKTGICSSDIHFYQHGKIGNYILTK
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	MVANPSVLNKKIDEIVFENQEAPTITEPTDVIQVVKKTGICSSDIHFYQHGKIGNYILTK
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	MVANPSVLNKKIDDITFEYEAPEIVEPTDVIQVVKKTGICSSDIHYAHGKIGNFIITK
<i>S. stiptis</i>	MTANPSVLNKKIDDISFETYDAPEISEPTDVLQVVKKTGICSSDIHFYAHGKIGNFVLTK
	*: *****: : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	PMVLGHESSGIVSAVGKVTSLIKVGDKVAIEPGVPSHSDAYGGHYNLCPHMFAATPN
<i>C. tropicalis</i>	PMVLGHEAGVVSAGVSEVTNLKVGDRVAIEPGVPSRSDETSGHYNLCPHMSFAATPP
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	PMVLGHEAGVVTVEGPGVKNLHVGDNVAIEPGVPSRSDAYSGRYNLCPHMRFAATPS
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	PMVLGHEAGVVTVEGPGVKYLVGDNVAIEPGVPSRSDAYSGRYNLCPHMRFAATPS
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	PMVLGHEAGVVSQVGKGVKHLKVGDRVAIEPGIPERLSDAYSGHYNLCPHMCFAATPN
<i>S. stiptis</i>	PMVLGHEAGTVVQVGKGVTSLKVGDNVAIEPGIPERLSDAYSGHYNLCPHMAFAATPN
	*****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	SEDGGVNPFGTLCKYYKSPEDFLVKLPDHVSELGALVEPLTVGVHAAKLGSKIGFDVVV
<i>C. tropicalis</i>	VNPDEPNPQGTLCYYRVPCDFLFKLDPHVSELGAMVEPLTVGVHGCKLADLKFGEDVV
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	T-KDEPNPPGTLCYFKSPEDFLVKLPDHVSELGAMVEPLSVGVHACKIGRVKFGDTVA
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	T-KDEPNPPGTLCYFKSPEDFLVKLPDHVSELGAMVEPLSVGVHACKIGRVKFGDTVA
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	STEGEPNPPGTLCYFKSPEDFLVKLPDHVSELGAMVEPLSVGVHASKLGKVTFGDNVA
<i>S. stiptis</i>	SKEGEPNPPGTLCYFKSPEDFLVKLPDHVSELGALVEPLSVGVHACKLGSAVFGDYVA
	*: *****: : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	VFGAGPVGLLAAAVATKFGATKVMVVDVFESILEMAKIQIVATHTFNPKSGSN-KDLVAA
<i>C. tropicalis</i>	VFGAGPVGLLTAARTIGAKRMVVVDIFDNKLIKMAKDMGAATHFNASKTGGDYQDLKLS
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	VFGAGPVGLLTAATAKTFGTAQVVIIDVFENKLMQAKDIGVVTHTFNASKTGGYNDLIQH
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	VFGAGPVGLLTAATAKTFGAQVVIIDVFENKLMQAKDIGVVTHTFNASKTGGYNDLIQH
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	VFGAGPVGLLAAATAKTFGAARVIVIDVFENKLMQAKDIGAATHTFNASKTGGDYDLIAA
<i>S. stiptis</i>	VFGAGPVGLLAAAVATFGAKGVIVVDIFDNKLIKMAKDIGAATHTFNASKTGGSS-EELTKA
	*****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	FDNTEPSVMNECSGAEPCKISAVDILRVGGRYIQIGNSAKPVSFPMTFATKELTLFGSF
<i>C. tropicalis</i>	FDGVQPSVVLCTSGAQPCYMGVKILKAGGRFQVQGNAGGVNFFIADFSRELALYGSF
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	FGG-QPNVLECTGANPCVGVNICAAGGTFIQVGNAAAPVKFFPITFAMKELTLYGSF
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	FGG-QPNVLECTGADPCVGVNICAAGGTFIQVGNAAAPVKFFPITFAMKELTLYGSF
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	FDGVQPNVLECTGAEPCTAHGVQIAAPGRFRFQVQGNAGAAVKFFPITFATKELTLFGSF
<i>S. stiptis</i>	FGGNVMPVLECTGAEPCKIKLGVDAIAPGRFRFQVQGNAGPVSFPIITVFAMKELTLFGSF
	*: *****: : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	RYGFNDYKTSVAILDENYNGKENAAIDFESLITHRFKDDAIDAYDLVKGGNGCVKCI
<i>C. tropicalis</i>	RYGFGDYQTSIDILDRNYVNGKDKAPINFELLITHRFKDKDAIKAYDLVRAGNGAVKCLI
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	RYGFGDYQDAVNIFDANYINGKDKAPIDFERLITHRFKDDAIDAYDLVRSGCGAVKCLI
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	RYGFGDYQDAVNIFDANYINGKDKAPIDFERLITHRFKDDAIDAYDLVRSGCGAVKCLI
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	RYGFGDYQDAVNIFDANYINGKDKAPIDFERLITHRFKDDAIDAYDLVRSGCGAVKCLI
<i>S. stiptis</i>	RYGFNDYKTAVGIFDNTYQNGRENAPIDFELQILITHRYFKDAIEAYDLVRAGKAVKCLI
	***: ** : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Debaryomyces hansenii</i>	SGPE
<i>C. tropicalis</i>	DGPE
<i>S. passalidarum</i> HMD 16.2	DGPE
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.2	DGPE
<i>S. passalidarum</i> Y27907 XYL 2.1	DGPL
<i>S. stiptis</i>	DGPE

Figura 23. Alinhamento das seqüências de XDHs de *D. hansenii*, *C. tropicalis*, *S. stiptis*, *S. passalidarum* HMD 16.2 e *S. passalidarum* (XYL2.1 e XYL2.2). Os aminoácidos estão representados nas cores de acordo com a classificação: ácido, azul; basico rosa; hidrofóbico, vermelho; hidrofílico, verde. As posições dos aminoácidos que compõem o sítio catalítico, sítio ligante do segundo átomo de zinco, fenda do tipo Rossmann e o sítio de reconhecimento da enzima, estão enquadrados em preto, vermelho, amarelo e roxo, respectivamente.

Além disso, nestas sequências é possível visualizar a presença da fenda tipo Rossmann (Gly-X-Gly-X-X-Gly, marcado com caixa amarela na Figura 22), envolvido na ligação da coenzima. Os resíduos dos aminoácidos Asp<sup>207</sup>, Val<sup>208</sup>, Phe<sup>209</sup> e Asn<sup>210</sup> (marcado com caixa roxa na Figura 22), presentes na sequência de XDH de *S. passalidarum* HMD 16.2 deste trabalho, são análogos aos resíduos dos aminoácidos Asp<sup>208</sup>, Ile<sup>209</sup>, Phe<sup>210</sup> e Asn<sup>212</sup>, de *S. stiptis*, e muito provavelmente compõem o sítio de reconhecimento da coenzima (Watanabe et al., 2005), sendo a Asp<sup>207</sup>, o aminoácido conservado que poderia ligar o 2' e 3' do grupo hidroxil do NAD<sup>+</sup> na sua metade ribosil, compartilhando a especificidade pelo NAD<sup>+</sup>. De fato, com o intuito de eliminar a interação da ponte de hidrogênio entre o grupo 2'-OH e NAD<sup>+</sup> e introduzir a interação com NADP<sup>+</sup> e o grupo fosfato, Metzger and Hollenberg (1995), modificou a enzima XDH de *S. stiptis*, com as mutações (D207G) e (D207G/D210G). Estes mutantes exibiram nenhuma modificação em relação a NADP<sup>+</sup>, no entanto, em relação ao cofator NAD<sup>+</sup>, apresentaram uma diminuição de 11 vezes na afinidade da enzima a coenzima, comparada com a linhagem parental.

Conforme demonstrado por Watanabe et al (2005) e Biswas et al. (2013), a presença do segundo átomo de zinco, que mostra ter um papel estrutural e de estabilidade térmica, é composto por resíduos de cisteínas, nas posições Cys<sup>96</sup>, Cys<sup>99</sup> e Cys<sup>102</sup>. Na Figura 22, é possível visualizar também, que os aminoácidos nestas respectivas posições da enzima XDH de *S. passalidarum* HMD 16.2, são compostos por Ser<sup>96</sup>, Ser<sup>99</sup> e Tyr<sup>102</sup> (circulado em vermelho), tal fato se mostra consonante com a literatura, visto que esses aminoácidos Cys, presentes em muitos membros da família MDR, não são conservados em XDHs de leveduras, sugerindo que este segundo átomo de zinco pode ter sido perdido ao longo da evolução (Person et al., 2013).

Um número considerável de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes contendo os genes heterólogos XR e XDH de *S. stiptis* tem sido descrita nos últimos anos (Matsushika et al., 2009; Ho et al., 1998; Xiong et al., 2014; Konishi et al., 2015). Em diferentes linhagens de *S. stiptis* o  $K_m$  para NADH é 3 a 15 vezes maior que o  $K_m$  para NADPH (van Vleet and Jeffries 2009; Verduyn et al. 1985). Resultados semelhantes são encontrados na XR de *C. shehatae* clonada em *E. coli*, onde o  $K_m$  da enzima com NADH (150  $\mu$ M) foi superior à observada com NADPH, de 20  $\mu$ M (Wang et al., 2007); *Candida tropicalis*, 45  $\mu$ M<sub>NADPH</sub> e 162  $\mu$ M<sub>NADH</sub> (Zhang et al., 2009) e *Candida tenuis*, com  $K_m$  de 5  $\mu$ M<sub>NADPH</sub> e 25  $\mu$ M<sub>NADH</sub> (Hacker et al., 1999). Resultados mais satisfatórios obtivemos com *S. cerevisiae* expressando a XR de *S.*

*arborariae* (AMY-4), já que a enzima apresentou igual ou maior afinidade para NADH ( $12,8 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ), em relação a NADPH ( $26,1 \pm 11 \mu\text{M}$ ). Embora Mamoori et al. (2013) clonaram e expressaram a enzima XR de *S. passalidarum* em *S. cerevisiae*, codificada pelo gene *XYL1.2*, as atividades apresentadas foram de 1,55 e 0,48 U/[mg de proteína]<sup>-1</sup> utilizando NADH e NADPH, respectivamente. Entretanto, estes autores não realizaram nenhuma caracterização cinética detalhada desta enzima.

A afinidade pela xilose utilizando NADPH das linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes descritas neste estudo (AMY-2, AMY-3 e AMY-4), se assemelham com os  $K_m$  de XRs de *S. stiptis*, *C. tropicalis*, *C. tenuis*, obtidas através de expressão heteróloga em *S. cerevisiae* (Verduyn et al. 1985; Zhang et al., 2009; Hacker et al., 1999). Entretanto, considerando a afinidade por xilose utilizando NADH na *S. cerevisiae* AMY-4 ( $K_m$  de  $29 \pm 13 \text{ mM}$ ), vemos que esta apresenta afinidade superior à de *C. shehatae* ( $K_m$  de 160 mM) (Wang et al., 2007) e semelhante à de *C. parapsilosis* ( $K_m$  de 31 mM) (Lee et al., 2003).

A enzima xilitol desidrogenase da levedura *S. passalidarum* clonada e expressa em *S. cerevisiae* neste trabalho (linhagem AMY-5), codificada pelo gene *XYL2.2*, revelou uma enzima com atividade de 2,20 U/[mg de proteína] com somente o cofator NAD<sup>+</sup>, o que se assemelha com a maioria das XDH das espécies de levedura descritas na literatura (Rizzi et al., 1988; Watanabe et al., 2005; Ko et al., 2006; Biswas et al., 2013), mas difere da XDH da espécie *K. marxianus*, com uma atividade utilizando NADP<sup>+</sup> 145 vezes menor do que a enzima utilizando NAD<sup>+</sup> (Lulu et al., 2013). Mamoori et al. (2014) mostrou dados semelhantes ao clonar e expressar a enzima xilitol desidrogenase de *S. passalidarum* em *S. cerevisiae*, codificada pelo gene *XYL2.1*, utilizando um promotor e terminador constitutivo *TDH3*, com uma atividade enzimática de 2,32 U/[mg de proteína]<sup>-1</sup> com o cofator NAD<sup>+</sup> e nenhuma atividade utilizando o cofator NADP<sup>+</sup>.

Trabalhos de clonagem e expressão em *S. cerevisiae* da enzima xilitol desidrogenase de diferentes espécies, como *S. stiptis*, *C. tropicalis*, ou *D. hansenii*, mostram que sua afinidade pelo cofator NAD<sup>+</sup> (160-910  $\mu\text{M}$ ) e xilitol (12- 24 mM) são de baixa afinidade (Rizzi et al., 1988; Watanabe et al., 2005; Ko et al., 2006; Biswas et al., 2013). Estes resultados se mostram consoantes com os obtidos pela linhagem transformante *S. cerevisiae* AMY-5, que revelou uma enzima de baixa afinidade tanto pelo xilitol ( $86 \pm 13 \text{ mM}$ ) quanto pelo NAD<sup>+</sup> ( $521,2 \pm 155 \mu\text{M}$ ). É interessante ressaltar que as XDHs de *S. passalidarum* selvagens apresentam maiores atividades, quando comparadas as atividades de XDHs de outras espécies (Figura 7), uma característica

interessante visto que atividades maiores de XDHs permitem melhores desempenhos nas fermentações de xilose.

Analisando as sequências de aminoácidos das enzimas XR e XDH e suas respectivas cinéticas e atividades, é possível notar que enquanto muitas vezes uma mudança de até 50% em sua cadeia as XDHs ainda mantêm muitas das propriedades cinéticas, enquanto uma mínima variação na sequência de aminoácidos determina uma grande diferença em XRs. A significativa identidade de 52% da sequência obtida pela anotação automática com uma aldo-ceto redutase de *S. arborariae*, não foi suficiente para determinar atividade de XR. Em contrapartida, a sequência anotada como XDH de *K. marxianus* (Lulu et al., 2013), apresentou identidade de 51% com a XDH de *S. passalidarum* identificada neste trabalho, onde ambas apresentaram atividades e algumas propriedades cinéticas semelhantes.

Os crescimentos das linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes AMY 2-6 e AMY 4-6 (expressando a XR de *S. arborariae* e XDH de *S. passalidarum*, ou a XR e XDH de *S. passalidarum*, respectivamente) em meio sintético com 20 g/L de xilose, mostraram uma grande fase lag, sendo que as linhagens contendo a XR de *S. passalidarum* entraram na fase exponencial somente depois de 50 horas, enquanto que a linhagem contendo a XR de *S. arborariae*, depois de 24 horas. Agnolo (2014) e Fujitomi et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes com os genes do metabolismo da xilose (XR, XDH e XK de *S. stiptis*) expressos em linhagens de laboratório ou industriais de *S. cerevisiae*. Nas fermentações em batelada simples de xilose com maiores densidades celulares, a xilose passa a ser consumida mais rapidamente, sendo a xilose consumida quase totalmente em 20 horas. Novamente, resultados semelhantes foram observados em fermentações em batelada em xilose, por Agnolo (2014) e Fujitomi et al. (2012), onde a xilose foi quase totalmente consumida em 30 horas. No entanto, a quantidade de etanol produzida durante o consumo de xilose foi muito baixa, indicando que está ocorrendo metabolismo aeróbico do açúcar com priorização da formação de biomassa.

Quando a glicose estava presente no meio durante as co-fermentações, o nível de consumo de xilose caiu 20-37%, comparando com as fermentações contendo somente xilose como fonte de carbono. Isto provavelmente acontece, devido a competição entre os dois açúcares pelo mesmos transportadores durante a co-fermentação (Gonçalves et al., 2014). Outra provável explicação é a repressão exercida pelo Mig1, um importante e essencial fator de transcrição para o processo de repressão catabólica. Na presença de altos níveis de

glicose, Mig1 rapidamente move-se do citoplasma para o núcleo e se liga a promotores de genes reprimidos pela glicose, e quando as células são privadas de glicose, Mig1 é transportado de volta ao citoplasma, não mais exercendo a repressão pela glicose (Rolland et al., 2002).

Considerando nossos resultados, a linhagem *S. cerevisiae* AMY 4-6 (que expressa a XR de *S. arborariae* e a XDH de *S. passalidarum*), exibiu melhor desempenho em co-fermentar glicose e xilose, em relação as outras duas linhagens recombinantes desenvolvidas deste estudo, pois esta levedura foi capaz de consumir 37% da xilose presente no meio, enquanto ainda consumia glicose. Este feito surpreende, visto que em outros trabalhos este consumo simultâneo de glicose e xilose não é observado em proporções semelhantes (Xiong et al., 2011; Xiong et al., 2014; Konishi et al., 2015). Embora a produção volumétrica máxima de etanol da *S. cerevisiae* AMY 4-6 tenha sido também mais expressiva em relação as outras duas linhagens, muito possivelmente os carbonos provenientes da metabolização da xilose, foram direcionados em sua grande parte para a produção de xilitol. Em relação aos produtos obtidos nas fermentações, vemos um considerável aumento de ácido acético quando estas linhagens transformantes passam a co-fermentar glicose e xilose. Uma possível explicação seria a regeneração de NADPH, através da conversão de xilose a xilitol, gerando NADP<sup>+</sup> para a metabolização de acetaldeído para ácido acético e com isso desviando os carbonos da produção de etanol. Neste contexto, é sugerido deletar o gene *ALD6* para reduzir a produção de ácido acético pelas leveduras (Jo et al., 2016).

Outro fato observado nas fermentações contendo glicose e xilose, foi o aumento da produção de xilitol, quando comparado com as fermentações em batelada contendo apenas xilose. Resultados semelhantes foram observados em Xiong et al. (2014) e isto se deve ao fato que durante a fase de fermentação da glicose, o oxigênio foi consumido rapidamente e um excesso de NADH foi acumulado, acarretando em maior produção de xilitol durante a fase de fermentação de xilose. Da mesma forma, o glicerol produzido em pequenas quantidades nas co-fermentações contendo glicose e xilose, não foi observado em fermentações contendo xilose, visto que nenhum excesso de NADH poderia ser utilizado para a produção de glicerol.

Embora todas as análises enzimáticas e cinéticas das enzimas XR e XDH clonadas tenham sido caracterizadas sob a forte expressão mediada pelo promotor do gene *PGK1*, para fins comparativos, no momento em que estas duas enzimas foram inseridas juntas na levedura *S. cerevisiae*, o vetor de expressão pPGK, foi utilizado para a expressão

da XR, enquanto o vetor de expressão pTEF foi utilizado para a expressão da XDH. Mesmo o vetor pTEF ter um promotor que promove forte expressão, a expressão deste é considerada bastante inferior, quando comparado aos vetores pGPD e pPGK, por exemplo (Mumberg et al., 1995; Matshushika et al., 2008). Podemos comprovar este fato, considerando as atividades da enzima XDH de *S. passalidarum* clonada e expressa em *S. cerevisiae* deste trabalho, onde as análises da enzima mostram que enquanto a atividade desta enzima para a linhagem transformante AMY-5, sob a expressão do promotor PGK foi de 2,2 U/[mg proteína]<sup>-1</sup>, as atividades XDH das linhagens AMY 2-6, AMY 3-6 e AMY 4-6, sob a expressão do promotor TEF foram por volta 0,35 U/[mg proteína]. Considerando a relação XR/XDH, vimos que enquanto estas enzimas estavam sob a forte expressão do promotor PGK, essa relação variou entre 1,2- 2, enquanto que quando a enzima XDH estava sob a expressão do promotor TEF, a relação XR/XDH aumentou consideravelmente para valores entre 7,7 a 9,4.

Enquanto a mudança da preferência pelo cofator das enzimas XR e XDH é um pré-requisito para se evitar o desbalanço de cofatores e com isso o aumento na produtividade de etanol, Tamakawa et al. (2013) sugere que a razão das atividades dessas enzimas poderia ser balanceada também para promover a melhora do fluxo metabólico da xilose. Kim et al. (2012) demonstraram que a baixa expressão da enzima XDH, em relação a enzima XR, foi necessária para o aumento do acúmulo de xilitol e diminuição da produção de etanol. A análise de vários níveis de expressão das enzimas XR, XDH e XK, também demonstrou que a melhora na produção de etanol, assim como a diminuição da produtividade de xilitol, deve-se uma alta razão XDH/XR (Tamakawa et al., 2013).

Da mesma forma, Konishi et al. (2015) ao sobre-expressar o gene *GRE3*, *SOR1* (um gene análogo ao gene *SsXYL2*, presente em *S. cerevisiae*) e *XKS1* na levedura de laboratório *S. cerevisiae* CENPK 2-1C, cuja atividade AR/XDH foi de 0,16, demonstrou considerável produção de etanol a partir de 58,5% de xilose consumido. Outro estudo mostrou que a sobre-expressão do gene que codifica uma aldose redutase (*GRE3*), juntamente com a expressão heteróloga dos genes *XYL2* e *XYL3* de *S. stipitis* em *S. cerevisiae*, produziu rápido consumo de xilose e maior produção de etanol, quando comparou esta mesma linhagem expressando os 3 genes do metabolismo da xilose (*XYL1*; *XYL2* e *XYL3*) de *S. stipitis*. Esses resultados sugerem que o desbalanço redox causado pela diferença de cofatores entre XR e XDH, pode não ser a única limitação pela *S. cerevisiae* modificada e que a sua lenta

assimilação de xilose pode não ser primariamente causada pelo desbalanço redox e sim pela baixa produção de ATP durante a fermentação de xilose e aumento da relação XR/XDH (Kim et al., 2013).

Em um recente estudo, Lopes et al. (2016) demonstrou que a levedura *S. girioi*, cujas atividades de XR e XDH foram de 0,94 U/[mg proteína] e 0,19 U/[mg proteína], respectivamente, produziu altos níveis de xilitol (10,8 g/L e 16,5 g/L) em fermentações em meios contendo xilose e xilose/glicose, respectivamente. Embora Matsushika & Sawayama (2011), demonstre com seus resultados que a alta razão XR/XDH aumente o consumo de xilose e a produção de etanol, cabe ressaltar que a linhagem utilizada com baixa razão de XR/XDH neste trabalho, apresentou níveis de expressão muito baixos (0,05 U/[mg proteína]) de XR, o que de fato prejudicaria o consumo de xilose. Igualmente, Matsushika & Sawayama (2008), demonstraram que a alta razão de XR/XDH aumenta a produção de etanol e diminui a produção de xilitol, quando a atividade de XK encontra-se moderada, porém, quando a atividade de XK encontra-se aumentada, a diminuição de xilitol ocorrerá com a diminuição da razão XR/XDH. É necessário salientar que em todas essas linhagens transformantes a atividade de XDH foi superior a atividade de XR (Matsushika & Sawayama, 2008; Matsushika & Sawayama, 2011).

Estudos referentes a expressão do gene *XYL3* e atividade da enzima xilulocinase, mostram que para que a levedura *S. cerevisiae* tenha condições ótimas de produção de etanol e crescimento em xilose, seria necessária a expressão moderada de *XYL3*, via seu próprio promotor (Jin et al., 2003; Matsushika et al., 2008). Esta condição se torna necessária possivelmente pela depleção de ATP, causada pelo aumento da fosforilação pela enzima, acarretando na diminuição da captação de xilose (Toivari et al., 2001; Johansson et al., 2001). Neste estudo, embora a atividade da enzima xilulocinase não tenha sido determinada, esta está sob a expressão do promotor *ADHI*, considerado de expressão moderada (Mumberg et al., 1995).

Apesar da baixa quantidade de etanol produzida pelas linhagens transformantes deste estudo poder ser atribuída a diferenças de expressão entre XR e XDH, vale lembrar, que a robustez superior das linhagens industriais melhoram a produção de etanol, em relação as leveduras de laboratório. Este feito pôde ser demonstrado por Konishi et al. (2015), ao comparar a produtividade de etanol da levedura *S. cerevisiae* CENPK2-1C, com uma linhagem industrial. Portanto, seria interessante avaliar as enzimas clonadas no presente trabalho em

linhagens industriais de *S. cerevisiae*.



## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou identificar e caracterizar, através de expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, as enzimas do metabolismo da xilose (xilose redutase e xilitol desidrogenase), das novas espécies de leveduras brasileiras, *S. arborariae* e *S. passalidarum*, isoladas de madeira em decomposição, com o intuito de viabilizar um melhor consumo de xilose e produção de etanol. Dentre os parâmetros avaliados foi possível concluir:

- Utilizando-se do genoma sequenciado da *S. arborariae* e análises do banco de dados NCBI, foi possível observar que enquanto a levedura *S. passalidarum* possui duas ORFs codantes para as enzimas xilose redutases e xilitol desidrogenase, com propriedades cinéticas distintas, a levedura *S. arborariae* possui somente uma ORF para a XR.

- A clonagem e expressão da enzima xilose redutase a partir de *S. arborariae* em *S. cerevisiae* demonstrou uma enzima com atividade semelhante à presente nesta levedura para ambos os cofatores, NADPH e NADH. A clonagem e expressão da enzima xilitol desidrogenase de *S. passalidarum*, revelou uma enzima exibindo alta atividade e estrita dependência ao cofator NAD<sup>+</sup>.

- Embora o domínio que revela afinidade da xilose redutase com os cofatores mais bem entendido (o domínio IPKS) seja importante, o gene clonado de *S. arborariae* muito provavelmente utiliza outros resíduos para a ligação do cofator NADH, como o Glu<sup>29</sup> e Lys<sup>60</sup>, uma vez que a diferença entre esses dois aminoácidos determina uma grande diferença na atividade desta enzima de *S. arborariae* em relação à enzima de *S. roraimenenses*, que é NADPH-dependente. A presença do aminoácido Lys<sup>59</sup>, além do Asp<sup>29</sup> não se mostrar conservado na ORF *XYL1.2* anotada de *S. passalidarum*, cuja atividade com NADH já foi verificada, também reforçam essa conclusão.

- Considerando as expressões heterólogas em *S. cerevisiae* de XRs provenientes das leveduras *S. stiptis*, *C. shehatae*, *C. tropicalis* e *C. tenuis* descritos na literatura, resultados mais satisfatórios obtivemos com *S. cerevisiae* expressando XR de *S. arborariae* (AMY-4), em relação a afinidade da enzima com o cofator NADH. Da mesma forma, a afinidade da XR de *S. arborariae* pela xilose utilizando NADH apresentou afinidade superior, quando comparada com a XR de *C. shehatae*, e semelhantes à XR de *C. parapsilopsis*.

- A linhagem de laboratório *S. cerevisiae* CENPK 2-1C, a qual demonstrou ser incapaz de crescer em xilose, quando teve as enzimas do metabolismo da xilose expressas (XR, XDH e XK), exibiu crescimento

em xilose com uma grande fase lag, porém consumindo entre 80-92% da xilose do meio.

- As linhagens transformantes (AMY 2-6; AMY 3-6; AMY 4-6) expressando a enzima XR, sob o promotor PGK e a enzima XDH, sob o promotor TEF, além da sua XK sobre-expressa, exibiu considerável produção de xilitol e baixa produção de etanol.

- Embora as linhagens transformantes tenham produzido pouco etanol, estas linhagens foram capazes de consumir xilose rapidamente e em sua totalidade, em fermentações em batelada contendo xilose como única fonte de carbono.

- Em fermentações contendo xilose e glicose, as linhagens transformantes foram capazes de consumir xilose, enquanto ainda consumiam glicose, porém a linhagem AMY 4-6 exibiu melhor desempenho em co-fermentar glicose e xilose.

## REFERÊNCIAS

- AGNOLO, D. D. Análise de Supressores da Fermentação de xilose em *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35(5), p. 355-66, 2008
- ANSELL, R., GRANATH, K., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M., & ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO journal**, v. 16, n. 9, p. 2179-2187, 1997.
- BANSAL, P; HALL, M; REALFF, M. J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**. v. 27, p.833-848, 2009.
- BARBOSA, A. C., CADETE, R. M., GOMES, F. C., LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2104-2106, 2009.
- BARKER, I.J., PETERSEN L., REILLY, P.J. Mechanism of Xylobiose Hydrolysis by GH43  $\beta$ -xylosidase. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 114, p.15389-93, 2010.
- BENGTOSSON, O.; HAHN-HÄGERDALL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. 2:9, 2009.
- BEZERRA, R. M.; DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 126(1), p.49-59, 2005

BISWAS, D.; DATT, M.; AGGARWAL, M.; MONDAL, A.K. Molecular cloning, characterization and engineering of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied Microbiol Biotechnology**. v. 97, p.1613–1623, 2013.

BOLEN, P.L. & DETROY, R.W. Induction of NADPH-linked d-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by d- xylose, l-arabinose or d- galactose. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 27, p. 302-307, 1985.

BOHREN, K. M., PAGE, J. L., SHANKAR, R., HENRY, S. P. AND GABBAY, K. H. Expression of human aldose and aldehyde reductases: site- directed mutagenesis of a critical lysine 262. **The Journal of Biological Chemistry**. 266, 24,031–24,037, 1991.

BOONTHAM, W., SIRICHA, K., SRISUK, N., TRAKULNALEAMSAI, S., & LIMTONG, S. *Candida tropicalis* Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Genes Cloning and Expression in Yeast. Não publicado, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 2012.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 247-254, 1976.

BRAT, D, BOLES, E., WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 2304-11, 2009.

BUIJS, N.A., SIEWERS, V., ANDNIELSEN, J. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 17, p. 480–488, 2013.

BUTLER, G., RASMUSSEN, M. D., LIN, M. F., SANTOS, M. A., SAKTHIKUMAR, S., MUNRO, C. A. & AGRAFIOTI, I. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.

CADETE, R. M. ; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-

xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.1338-1342, 2009

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, S. S.; ZILLI, VITAL J. E.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PloS one**, 7(8), e43135, 2012.

CADETE, R. M. ; MELO, M. A.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; ; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. *Spathaspora brasilienses* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov., *Spathaspora xylofermentans* sp. nov, four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhouek**. v. 103, p. 421-23, 2013.

CAI, Zhen; ZHANG, Bo; LI, Yin. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 1, p. 34-46, 2012.

CARIOCA, J.O. Biofuels: problems, challenges and perspectives. **Journal of Biotechnology**. v. 5(3), p. 260-73, 2010

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**, terceiro levantamento, safra 2012/2013, dezembro/2012. Brasília, 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**, terceiro levantamento, safra 2015/2016, dezembro/2015. Brasília, 2015.

CUNHA-PEREIRA, F. da; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.B. de; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**. v.102, p. 4219-25, 2011.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 578-595, 2009

DEMARINI, D. J.; CARLIN, E. M.; LIVI, G. P. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, n. 8, p. 723-728, 2001.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, HUIMIN. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular Biosystems**. V 11, p. 2150-2156, 2010.

DUJON, Bernard et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35-44, 2004.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.C.; HAHN-HÄGERDALL, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2 and XSK1 in mineral medium chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**.v. 66(8), p. 3381-3383, 2000.

ELIASSON, A.; HOFMEYR, J. H. S., PEDLER, S., & HAHN-HÄGERDAL, B. The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4, p. 288-297, 2001.

ENTIAN, K-D & KÖTTER, P. 23 yeast mutant and plasmid collections. **Methods in Microbiology**. v. 26, p. 431-449, 1998.

EKLUND, H.; RAMASWAMY, S. Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 24, p. 3907-3917, 2008.

FERNANDES, S.; TUOHY, M. G.; MURRAY, P. G. Xylose reductase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*: cloning and heterologous expression of the native gene (Texr) and a double mutant (Texr K271R+ N273D) with altered coenzyme specificity. **Journal of biosciences**, v. 34, n. 6, p. 881-890, 2009.

FLANAGAN, T. & WAITES. M.J. Purification and characterization of d-xyluloquinase from the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* NCYC 1541. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, p. 975-980, 1992.

FUJITOMI, K., SANDA, T., HASUNUMA, T., & KONDO, A. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 161-166, 2012.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 108, p. 41-65, 2007.

GARAY-ARROYO, A., AND A. A. COVARRUBIAS. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* v. 15, p. 879–892. 1999.

GÁRDONYI, M.; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C; SPENCER-MARTINS, I; HAHN-HÄGERDALL. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**. v.3, p. 45-52, 2003.

GIETZ, D.; ST JEAN, A.; WOODS, R.A.; SCHIESTL, S.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Research**. v. 20, p. 1425, 1992.

GÍRIO FM, FONSECA C, CARVALHEIRO F, DUARTE LC, MARQUES S, BOGEL-ŁUKASIK R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology** 101:4775-4800, 2010.

GOLDENMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**. v. 5813, p. 808-10, 2007

GOLDENMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. v. 1, p. 1-7, 2008.

GONÇALVES, D.L.; MATSUSHIKA, A.; SALES, B.B.; GOSHIMA, T.; BON, E.P.S.; STAMBUK, B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant individual hexose transportes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 63, p. 13-20, 2014.

GHOSH, D.; SAWICKI, M.; PLETNEV, V.; ERMAN, M., OHNO, S.; NAKAJIN, S.; DUAX, W. L. Porcine carbonyl reductase structural basis for a functional monomer in short chain

dehydrogenases/reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 18457-18463, 2001.

GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. 695-699, 2010.

HÄCKER, B.; HABENICHT, A.; KIESS, M.; MATTES, R. Xylose utilisation: cloning and characterisation of the xylose reductase from *Candida tenuis*. **Biological chemistry**, v. 380, n. 12, p. 1395-1403, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

HAHN-HAGERDAL B; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 933-943, 1994.

HAHN-HAGERDAL B.; KARHUMAA K.; FONSECA C.; SPENCER-MARTINS I; GORWA-GRAUSLUND M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 937-953, 2007.

HALLBORN, J., WALFRIDSSON, M., AIRAKSINEN, U. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. v. 9, 1090– 1095, 1991.

HAMACHER T., BECKER J., GÁRDONYI M., HAHN-HAGERDAL B., BOLES E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.

HANUKOGLU, Israel. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 206-209, 2015.

HARNER, N. K., WEN, X., BAJWA, P. K., AUSTIN, G. D., HO, C. Y., HABASH, M. B.; LEE, H. Genetic improvement of native xylose-



fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 1-20, 2015.

HASUNUMA, T.; ISMAIL, K.S.K.; NAMBU, Y.; KONDO, A. Co-expression of TAL1 AND ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117 (2), p. 165-69, 2014.

HO, N.W.Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1852-1859, 1998.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG E. L.; HOWARD S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 602-619, 2003

HOU. X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 94 (1), p. 205-214, 2012.

JEFFRIES, T. W., ALEXANDER, M. A. Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. In: KIRK, T. K.; CHANG, H-M. **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**. Boston: Butterworth-Heinemann, p. 311-321 1990.

JEFFRIES T. W.; KURTZMAN C.P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xilose-fermenting yeasts, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 922-932, 1994

JEFFRIES T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17 p. 320-326, 2006

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A., SALAMOV, A.; JIN, Y. S. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JEFFRIES T. W & VAN VLEET, J.R.H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast research**. v.9, p. 793-807, 2009.

JEFFRIES T. W.; WILLIS, L.B.; LONG, T.M.; SU Y-K, inventores; Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wi (US); U.S. Department of Agriculture. Washington, DC (US). Co-fermentation of glucose, xylose and cellobiose by yeast. **United States Patente US 8,530,211 B2**. 2013 Set 10.

JEPPSSON, M.; BENGTSSON, O., FRANKE, K., LEE, H., HAHN-HÄGERDAL, B., & GORWA-GRAUSLUND, M. F.. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher KM for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 665-673, 2006.

JO, S. E., SEONG, Y. J., LEE, H. S., LEE, S. M., KIM, S. J., PARK, K., & PARK, Y. C. Microaerobic conversion of xylose to ethanol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SX6 MUT expressing cofactor-balanced xylose metabolic enzymes and deficient in ALD6. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 72-78, 2016.

JOJIMA, T.; OMUMASABA, C.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugars transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 85, p. 471-480, 2010.

KARHUMMA, K.; GARCIA, R.S.; HAHN-HÄGERDAL B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparison of the xylose reductase, xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for the fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v. 6:5, 2007.

KHATTAB, S. M. R., WATANABE, S., SAIMURA, M., & KODAKI, T.. A novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase constructed by site-directed mutagenesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 2, p. 634-637, 2011.

KILIAN S. G.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. The kinetics and regulation of M-xylose transport in *Candida utilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 357–360, 1993

KIM, S. R.; HA, S. J.; KONG, I. I.; JIN, Y. S. High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 4, p. 336-343, 2012.

KIM, S. R.; KWEE, N. R., KIM, H., & JIN, Y. S. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 3, p. 312-321, 2013.

KLIMACEK, M., M.SZEKELY, R. GRIESSLER, AND B. NIDETZKY Exploring the active site of yeast xylose reductase by site-directed mutagenesis of sequence motifs characteristic of two dehydrogenase/reductase family types. **FEBS Letters**. 500:149–152, 2001.

KO, B. S.; JUNG, H. C.; KIM, J. H. Molecular Cloning and Characterization of NAD<sup>+</sup>-Dependent Xylitol Dehydrogenase from *Candida tropicalis* ATCC 20913. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 6, p. 1708-1714, 2006.

KONISHI, J., FUKUDA, A., MUTAGUCHI, K., & UEMURA, T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 8, p. 1623-1630, 2015.

KOSTRZYNSKA, M., SOPHER, C. R. AND LEE, H. Mutational analysis of the role of the conserved lysine-270 in the *Pichia stipitis* xylose reductase. **FEMS Microbiological. Letters**. 159, 107–112, 1998

KOTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 776-783, 1993

KRATZER, REGINA, DAVID K. WILSON, AND BERND NIDETZKY. Catalytic mechanism and substrate selectivity of aldo-keto

reductases: Insights from structure-function studies of *Candida tenuis* xylose reductase. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. 58.9: 499-507, 2006.

KRISTO, P., SAARELAINEN, R., FAGERSTRÖM, R., AHO, S., & KORHOLA, M. Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley. **European journal of biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 240-246, 1996.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35(5), p. 377-91, 2008.

LACHANCE, M. A., BOEKHOUT, T., SCORZETTI, G., FELL, J. W., & KURTZMAN, C. P. *Candida Berkhout* (1923). In: KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T (eds) **The yeasts, a taxonomic study**, v. 2, p. 987-1278, 2011.

LEANDRO, M.; GONÇALVES, P; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of the yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. **Biochemical Journal**. v. 395, p. 543-549, 2006.

LEANDRO, M.; SPENCER-MARTINS, I GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitador. **Microbiology**. v. 154, p. 1646-1655, 2008.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**. v. 9(4), p. 511-525, 2009

LEE, H. The Structure and Function of Yeast Xylose (Aldose) Reductases. **Yeast**. v. 14, p. 977-984, 1998.

LEE, J-K; KOO B-S; KIM S-Y. Cloning and Characterization of the *xyII* Gene, Encoding an NADH-Preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis* and its Functional Expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69 (10), p. 6179-88, 2003.

LEE, S. H.; KODAKI, T.; PARK, Y. C.; SEO, J. H. Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 184-191, 2012.

LIU, Z.L.; MOON, J., ANDERSH, B. J., SLININGER, P. J., & WEBER, S. Multiple gene-mediated NAD (P) H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 743-753, 2008.

LOBO, F. P.; GONÇALVES, D. L.; ALVES-JR, S. L. GERBER, A.L.; DE VASCONCELOS, A.T.R.; BASSO, L.C.; FRANCO, G.R.; SOARES, M.A.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A., STAMBUK, B.U. Draft genome sequence of the xylose-fermenting yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-H.M. 19.1a. **Genome announcements**, v.2, p. e01163-13, 2014.

LONG, T.M.; SU Y-K; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES T. W. Cofermentation of glucose, xylose and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78(16), p. 5492-5500, 2012.

LOPES, M; MORAIS, C.; KOMINEK, J.; CADETE, R.; SOARES, M.A.; UETANABARO, A.P.; FONSECA, C.; LACHANCE, M-A; HITTINGER, C.; ROSA, C. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov., and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**, Manuscript ID FEMSYR-16-02-0027.R1, 2016.

LULU, L.; LING, Z.; DONGMEI, W.; XIAOLIAN, G. HISANORI, T.; HIDEHIKO, K.; JIONG, H. Identification of a Xylitol Dehydrogenase Gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Molecular Biotechnology**. v. 53, p. 159–169, 2013.

MA, M.; LEWIS, L. Z.; MOON, J. Genetic Engineering of inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for improved xylose utilization in ethanol production. *BioEnergy Research*. v. 5, p. 459-69, 2012.

MACHOVÁ, E. Induction of aldose reductase and polyol

dehydrogenase activities in *Aureobasidium pullulans* by d-xylose, l-arabinose and d-galactose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 374-377, 1992.

MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; USHIDA, K.; KANAI, D.; KATAHIRA, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V. S.; KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 1067–1078, 2009.

MAEHARA, T.; TAKABATAKE, K.; KANEKO, S. Expression of *Arabidopsis thaliana* xylose isomerase gene and its effect on ethanol production in *Flammulina velutipes*. **Fungal biology**, v. 117, n. 11, p. 776-782, 2013.

MAMOORI, Y. I.; YAHYA, A. G. I.; AL-JELAWI, M. H. Expression Of Xylose Reductase Enzyme From *Spathaspora passalidarum* In *Saccharomyces cerevisiae*. **Iraqi Journal of Science**, v. 54, p. 316-323, 2013.

MAMOORI, Y.I.; AL-JELAWI, M.H.; YAHYA, A.G.I. Cloning and expression of xylitol dehydrogenase enzyme from *Spathaspora passalidarum* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Al-Nahrain University Science**, v. 17(1), p. 123-131, 2014.

MATSUSHIKA, A & SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 306-9, 2008.

MATSUSHIKA, A & SAWAYAMA, S. Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. **Technology Enzyme and Microbial**, v. 48, p. 466-71, 2011.

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAIKINO, K.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP+-dependent xylitol dehydrogenase increase ethanol production from xylose in recombinant

*Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 81, p. 243–255, 2008a.

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP+-dependent xylitol dehydrogenase, and xyluloquinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 105; p. 296-299, 2008b.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 84, p. 37-53, 2009a.

MATSUSHIKA, A., INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAIKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP+-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3818-3822, 2009b.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COQLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p.597-600, 2013.

METZGER, M. H.; HOLLENBERG, C. P. Amino Acid Substitutions in the Yeast *Pichia stipitis* Xylitol Dehydrogenase Coenzyme-Binding Domain Affect the Coenzyme Specificity. **European journal of biochemistry**, v. 228, n. 1, p. 50-54, 1995.

MOON, J.; LIU, Z.L.; MA, M.; SLININGER, P.J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 2, p. 247-54, 2013.

MOURO, A. Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MÜLLER, G. Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119-122, 1995.

NGUYEN, N; SUH, S.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp.nov. **Mycological Research**. v. 110, p. 1232-1241, 2006.

NGUYEN NH, SUH S-O, BLACKWELL M. *Spathaspora* NGUYEN, SUH AND BLACKWELL. In: KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T (eds) **The yeasts: a taxonomic study**, 5th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 795–797, 2011

NORDLING, E.; JÖRNVALL, H.; PERSSON, B. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4267-4276, 2002.

OPPERMANN, U.; Filling, C.; Hult, M., Shafqat N.; Wu, X.; Lindh, M.; Jörnvall, H. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. **Chemico-biological interactions**, v. 143, p. 247-253, 2003.

PAPADOPOULOS JS & AGARWALA R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. **Bioinformatics** 23:1073-79, 2007.

PAPON, N.; COURDAVALT, V.; CLASTRE, M. Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. **Trends in Biotechnology**. v. 32, p. 167-168, 2014.

PERSSON, B., ZIGLER, J.S. JR & JÖRNVALL, H. A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including ζ-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone



oxidoreductase, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. **European Journal Biochemistry**.v. 226, p. 15–22, 1994.

PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. PCR-based engineering of yeast genome. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 445-469, 2002.

PETSCHACHER, B. & NIDETZKY, B. Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site-directed mutants under simulated in vivo conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6390-6393, 2005.

PETSCHACHER, B.; LEITGEB, S., KAVANAGH, K., WILSON, D., & NIDETZKY, B. The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. **Biochemical Journal**, v. 385, p. 75-83, 2005.

RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Purification and Properties of the NAD<sup>+</sup> - Xylitol Dehydrogenase from the *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.67, p.20-24, 1989.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 2, p. 183-201, 2002.

SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O.V.; SIBIRNY, A.A.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.74, p. 1041-1052, 2007.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. *Molecular cloning*. vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989

SANDERSON, K. Biofuels. **Nature**.v 474, nº 7352, s 12-s.14, 2010.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha da

cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. v. 35, p. 1000-1004, 2012.

SALES, B. B. de. Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em linhagem de *S. cerevisiae* recombinantes. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SALES, B., B., SCHEID, B., GONÇALVES, D. L., KNYCHALA, M. M., MATSUSHIKA, A., BON, E. P., & STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 10, p. 1973-1982, 2015.

SCHULZ, G. E.; SCHIRMER, R. H.; PAI, E. F. FAD-binding site of glutathione reductase. **Journal of molecular biology**, v. 160, n. 2, p. 287-308, 1982.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, n. 539, p. 1-6, 2011.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A; MANCILHA, I. M. Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts A Review. **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 331-339, 1998.

STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-xylose transport by *Candida Succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.105-108 p. 255-263, 2003.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. A. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; Bom, E. P. S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 67, p. 918 926, 2008.

STEENSELS, J., SNOEK, T., MEERSMAN, E., NICOLINO, M. P., VOORDECKERS, K., & VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 5, p. 947-995, 2014.

SUZUKI, T. AND ONISHI, H. Purification and properties of polyol: NADP oxidoreductase from *Pichia quercuum*. **Agricultural and Biological Chemistry**. 39, 2389-2397, 1975.

TAMAKAWA, H.; IKUSHIMA, S.; YOSHIDA, S. Construction of a *Candida utilis* strain with ratio-optimized expression of xylose-metabolizing enzyme genes by cocktail multicopy integration method. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 5, p. 532-539, 2013.

TANINO, T., HOTTA, A., ITO, T., ISHII, JUN., YAMADA, R., HASUNUMA, T., OGINO, O., OHMURA, N., OHSHIMA T., KONDO, A. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 88, p. 1215-21, 2010.

TANINO, T.; ITO, T.; OGINO, O.; OHMURA, N.; OHSHIMA T.; KONDO, A. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xylose isomerase pathway. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 114(2), p. 209-11, 2012.

TOIVARI, M.H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. C. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. **Metabolic Engineering**. v. 3, p. 236-49, 2001.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E. van den.; DIJKEN, J.P. van; SCHEFFERS, W.A. Alcoholic fermentation of d-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 47(6), p. 1221-23, 1984.

TRÄFF, K. L.; CORDERO, R. O., VAN ZYL, W. H., & HAHN-HÄGERDAL, B. Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the *xylA* and *XKS1*

Genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5668-5674, 2001.

VERDUYN C., VAN KLEEF R., FRANK J., SCHREUDER H., VAN DIJKENJ. P., SCHEFFERS W. A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical Journal**.v. 226, 669-677, 1985.

VERHO, R.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69 (10), p. 5892-97, 2003.

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILÄ, M.; KERÄNEN, S.; HAHN-HÄGERDALL, B. Xylose-Metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressing the TKL1 and TAL1 Genes Encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61(12), p. 4184-4190, 1995.

WANG, J. F., WEI, D. Q., LIN, Y., WANG, Y. H., DU, H. L., LI, Y. X., & CHOU, K. C. Insights from modeling the 3D structure of NAD (P) H-dependent d-xylose reductase of *Pichia stipitis* and its binding interactions with NAD and NADP. **Biochemical and biophysical research communications**, 359(2), 323-329, 2007

WANG, X.; FANG, B.; LUO, J.; LI, W.; ZHANG, L. Heterologous expression, purification, and characterization of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Biotechnology letters**. v. 29, p. 1409-12, 2007.

WANG, Y., REN, Y. C., ZHANG, Z. T., KE, T., & HUI, F. L. *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2016

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete Reversal of Coenzyme Specificity of Xylitol Dehydrogenase and Increase of Thermostability by the Introduction of Structural Zinc\*. **The Journal of Biological Chemistry**. n. 280, n°11, p. 10340-49, 2005.

WATANABE, S.; SALEH, A.A.; PACK, S.P.; ANNALRU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP<sup>+</sup> - dependent xylitol dehydrogenase. **Journal of Biotechnology**. v. 130, p. 316-319, 2007.

WEYDA, I.; LÜBECK M.; AHRING, K.; LÜBECK. Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Arpergillus carbonarius*. **Metabolic Engineering and Synthetic Biology**. v. 41, p. 733-39, 2014.

WILSON, D. K., BOHREN, K. M., GABBAY, K. H. AND QUIOCHO, F. A. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. **Science**. 257, 81–84, 1992.

WOODYER, RYAN,<sup>1</sup> MICHAEL SIMURDIAK,<sup>2</sup> WILFRED A. VAN DER DONK,<sup>1\*</sup> AND HUIMIN ZHAO. Heterologous expression, purification, and characterization of a highly active xylose reductase from *Neurospora crassa*. **Applied and environmental microbiology** 71.3, 1642-1647, 2005.

WOHLBACH, D. KUO, A., SATO, T. K., POTTS, K. M., SALAMOV, A. A., LABUTTI, K. M., LUCAS, S. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

XIONG, M, CHEN, G., BARFORD, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 9206-9215, 2011.

XIONG, M., WOODRUFF, A., TANG, X., TIAN, X., ZHANG, J., & CAO, L. Comparative study on the mutated xylose reductase to increase ethanol production in xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 605-610, 2013.

XIONG, M.; CHEN, G.; BARFORD, J. Genetic engineering of yeasts to improve ethanol production from xylose. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 1, p. 32-39, 2014.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 414-417, 2003.

YOKOYAMA, S., SUZUKI, T., KAWAI, K., HORITSU, H., AND TAKAMIZAWA, K. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent p-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 79, p. 217-223, 1995.

YOKOYAMA, S-I; KINOSHITA, Y.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Cloning and sequency of two xylose reductases genes (*xyrA* and *xyrB*) from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 80, p. 603-605, 1995.

YOUNG, E; POUCHER A; COMER A.; BAILEY A.; ALPER, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Applied Environmental Microbiology**. v. 77, p. 3311-3319, 2011

ZHA, J.; SHEN, M.; HU, M.; SONG, H.; YUAN, Y. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 41, p. 27-39, 2014.

ZHANG, Y.H.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 35(5), p. 367-75, 2008.

ZHANG, F.; QIAO, D.; XU, H.; LIAO, C.; LI, S.; CAO, Y. Cloning, expression, and characterization of xylose reductase with higher activity from *Candida tropicalis*. **The Journal of Microbiology**. v.47, p.351-57, 2009.

ZHANG, G.-C.; LIU, J.-J.; DING, W.-T. Decreased xylitol formation during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* due to overexpression of water-forming NADH oxidase. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1081-1086, 2012.

ZHA, J.; HU, M-L; SHEN, M-H.; LI, B-Z.; WANG, J-Y.; YUAN, Y-J. Balance of XYL1 and XYL2 expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation. **Frontiers in Microbiology**. v. 3 (355), p. 1-10, 2012.

ZHOU, H., CHENG, J. S., WANG, B. L., FINK, G. R., & STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Sequência de aminoácidos do gene xilose redutase (*XYL1*) de *Spathaspora arborariae* HM 19.1a

MATIKLSSGHLMPAVGFGCWKVDKATAAEQIYQAIKAGYRLFD  
GAEDYGNEKEVGDGLKKAIDEGLVKREELFITSKLWNNYHDPK  
NVETALNRTLSDLQLDYVDLFLIHFPIAFKFVPLEEKYPPGFYCG  
DGDNFHYESVPLLDTWKALEKLVHAGKIKSIGISNFPGALIYDLC  
RGATIKPAVLQIEHHPYLQQPKLIEYVQKQGIQAVTAYSSFGPQSFI  
ELNQNRALNTPTLFEHDTIKSIASRLNKSPAQVLLRWASQRGIAV  
IPKSNSPARLAENLDVTSFDLTDADFEAISKLDINLRFNDPWDWD  
NIPIFV#

### ANEXO 2

Sequência de aminoácidos do gene xilose redutase (*XYL1.1*) de *Spathaspora passalidarum* HMD 16.2

MATIKLSSGHLMPLVGFGCWKVDNATAADQIYNAIKAGYRLFD  
GAEDYGNEKEVGDGLKRAIDEGLVKREELFITSKLWNNYHDPK  
NVETALNRTLSDLQLDYVDLFLIHFPIAFKFVPLEEKYPPGFYCG  
DGDNFHYENVPLLDTWKALEKLVEAGKIKSIGISNFPGALIYDLV  
RGATIKPAVLQIEHHPYLQQPKLIEYVQKQGIQAITAYSSFGPQSFL  
ELNQNRALNTPTLFEHDTIKSISTRNLNKTTPAQVLLRWATQRNIAV  
IPKSNNPARLAQNLDVTSFDLTEEDFNTISALDINLRFNDPWDWD  
NIPIFV#

### ANEXO 3

Sequência de aminoácidos do gene xilose redutase (*XYL1.1*) de *Spathaspora passalidarum* HMD 1.3

MATIKLSSGHLMPLVGFGCWKVDNATAADQIYNAIKAGYRLFD  
GAEDYGNEKEVGDGLKRAIDEGLVKREELFITSKLWNNYHDPK  
NVETALNRTLSDLQLDYVDLFLIHFPIAFKFVPLEEKYPPGFYCG  
DGDNFHYENVPLLDTWKALEKLVEAGKIKSIGISNFPGALIYDLV  
RGATIKPAVLQIEHHPYLQQPKLIEYVQKQGIQAITAYSSFGPQSFL  
ELNQNRALNTPTLFEHDTIKSISTRNLNKTTPAQVLLRWATQRNIAV  
IPKSNNPARLAQNLDVTSFDLTEEDFNTISALDINLRFNDPWDWD  
NIPIFV#

### ANEXO 4

Sequência de aminoácidos do gene xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *Spathaspora passalidarum* HMD 16.2



MVANPSLVLKKIDEIVFENQEAPTITEPTDVIVQVKKTGICGSDIH  
FYQHKGKIGNYILTKPMVLGHESAGVVTEVGPVKNLHVGDNVA  
IEPGVPSRFSDAYKSGRYNLCPHMRFAATPSTKDEPNPPGTLCKY  
FKSPEDFLVKLPDHVSLELGAMVEPLSVGVHACKIGRVKFGDTV  
AVFGAGPVGLLTAATAKTFGTAKVIIIDVFDNKLQMAKDIGVVT  
HTFNSKTDGDYNDLIQHFGGQPNVVLECTGANPCVGMGVNICA  
PGGTFIQVGNAATPVKFPITEFAMKELTLYGSFRYGFGDYQDAV  
NIFDANYKNGKDKAPIDFERLITHRFKFDDAIKAYDLVRSGCGA  
VKCLIDGPE#